

NATHANE PAIS SIQUEIRA

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS METABÓLICOS E
IMUNOLÓGICOS DA SUBSTITUIÇÃO DA FONTE LIPÍDICA DA
DIETA POR ÓLEO DE COCO VIRGEM (*Cocos nucifera L.*) EM
RATAS WISTAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S618a
2016

Siqueira, Nathane Pais, 1991-

Avaliação dos parâmetros metabólicos e imunológicos da substituição da fonte lipídica da dieta por óleo de coco virgem (*Cocos nucifera* L.) em ratas *Wistar*. / Nathane Pais Siqueira. – Viçosa, MG, 2016.

xviii, 74f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexo.

Inclui apêndice

Orientador: Maria do Carmo Gouveia Peluzio.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Óleo de coco. 2. Lipídeo. 3. Metabolismo dos lipídeos.
4. Inflamação. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Nutrição e Saúde. Programa de Pós-graduação em Ciência da
Nutrição. II. Título.

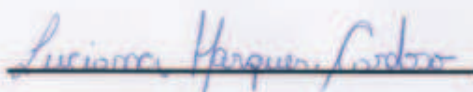
CDD 22 ed. 665.355

NATHANE PAIS SIQUEIRA

AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS METABÓLICOS E
IMUNOLÓGICOS DA SUBSTITUIÇÃO DA FONTE LIPÍDICA DA
DIETA POR ÓLEO DE COCO VIRGEM (*Cocos nucifera* L.) EM
RATAS WISTAR

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação
em Ciência da Nutrição, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de julho de 2016.



Luciana Marques Cardoso



Manoela Maciel dos Santos Dias
(Coorientadora)



Maria do Carmo Gouveia Peluzio
(Orientadora)

*Dedico esta dissertação a Deus, a minha família e a todos
que, de alguma forma, participaram dessa conquista.*

Com carinho e gratidão!

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.”

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me permitir chegar até aqui e por estar sempre presente em minha vida, em todos os momentos de dúvidas, medos e incertezas.

Aos meus pais, Lúcia e Natalino, por serem minha base e meu porto seguro. Por todo amor incondicional, apoio e conselhos. Amo vocês!

Ao Wiliam, por todo amor, paciência e carinho. Por você ter acreditado mais em mim que eu mesma, muito obrigada!

Ao meu irmão, Raoni, em quem eu me espelhei pra chegar até aqui.

À minha querida orientadora, Prof^a Maria do Carmo, pelas oportunidades e pelos ensinamentos desde o início da graduação. Obrigada pela amizade, convivência e pela disposição em ajudar, proporcionando meu crescimento pessoal e profissional.

À querida prima Flávia, por toda ajuda e por todo ensinamento que permitiram que esse trabalho começasse e terminasse. À Sandroca, pela imensa ajuda e pelo companheirismo de sempre. À Mari, pelo apoio e auxílio na conclusão dessa jornada. À Lisi, por estar sempre presente, pela ajuda e pelos conselhos. À Damilis, por todo o ensinamento, apoio e auxílio durante todos esses anos. Mesmo longe, você sempre esteve perto! À todas vocês, com muito carinho, obrigada!

À querida Rhavena, pelos vinte anos de amizade, amor e companheirismo, mesmo à distância, e ao Ronildo, vocês fizeram com que essa caminhada se tornasse mais leve.

À Le, que esteve sempre presente, pela amizade e pelo carinho.

Ao querido Seu Tonny, por toda ajuda nesses anos de convivência no laboratório.

Aos amigos da família LABIN atual e do coração, Aline, Lulu, Thais, Lara, Let's, Letícia, Bruna, Luís, Ricardo, Nando e Catarina. Obrigada a todos!

Às amigas do mestrado, Dani e Bárbara, e a amiga da vida, Debs.

Às amigas e companheiras de república, Kely, Thais e Michelle, por contribuírem para que essa reta final se tornasse mais leve.

Aos meus coorientadores, Professor Sérgio e Manoela, pelos ensinamentos, pela atenção e pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Nutrição e Saúde, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Aos funcionários e membros do Laboratório de Nutrição Experimental (DNS), do Laboratório de Análises Clínicas (DNS), do Laboratório de Biologia Celular (DBG) e do Laboratório de Morfofisiologia (DBA) pela atenção e apoio no período das análises.

Aos professores e funcionários do Departamento de Nutrição e Saúde, por todo ensinamento e auxílio.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e contribuição científica neste trabalho.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

E a todos, que de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho. Muito obrigada!

BIOGRAFIA

Nathane Pais Siqueira, filha de José Natalino Martins Siqueira e Maria Lúcia Janote Pais Siqueira, nasceu em Ponte Nova/MG, em 4 de março de 1991.

Em março de 2009, ingressou na Universidade Federal de Viçosa, onde cursou Nutrição, obtendo seu título de graduação em março de 2014.

Em agosto de 2014, ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição da Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de valor nutricional, funcional e controle de qualidade de alimentos e dietas.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
LISTA DE SÍMBOLOS.....	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS.....	3
2. 1 Geral.....	3
2. 2 Específicos	3
3 METODOLOGIA GERAL.....	4
3.1 Experimentação animal	4
3.1.1 Cálculo amostral.....	4
3.1.2 Modelo animal	4
3.1.3 Aspectos éticos	4
3.1.4 Desenho experimental	4
3.2 Óleos testes.....	7
3.3 Eutanásia e dissecação dos órgãos.....	7
3.4 Avaliação da ingestão alimentar e das medidas corporais.....	8
3.4.1 Consumo alimentar	8
3.4.2 Medidas corporais.....	8
3.5 Contagem e morfometria de adipócitos	9
3.6 Análises Bioquímicas.....	10
3.7 Avaliação da incorporação de ácidos graxos nos tecidos adiposo intra-abdominal, adiposo mesentérico e adiposo perirrenal e no fígado	10
3.8 Citocinas inflamatórias.....	11
3.9 Atividade das enzimas antioxidantes	12
3.10 Avaliação da peroxidação lipídica	13
3.11 Dosagem de proteínas	14

3.12 Análises estatísticas	14
4 REFERÊNCIAS.....	15
5 RESULTADOS.....	18
5.1 Artigo I: Efeitos do consumo de óleo de coco sobre o perfil lipídico em humanos: uma revisão sistemática	18
5.1.1 Resumo.....	18
5.1.2 Abstract.....	19
5.1.3 Introdução.....	20
5.1.4 Metodologia.....	20
5.1.5 Resultados	22
5.1.6 Discussão	32
5.1.7 Conclusão.....	36
5.1.8 Referências	37
5.2 Artigo II: Consumo de óleo de coco aumenta a expressão de marcadores inflamatórios e a incorporação de ácidos graxos saturados em tecidos de ratas Wistar	42
5.2.1 Resumo.....	42
5.2.2 Abstract.....	44
5.2.3 Introdução.....	46
5.2.4 Metodologia.....	47
5.2.5 Resultados	52
5.2.6 Discussão	60
5.2.7 Conclusão.....	65
5.2.8 Referências	66
6 CONCLUSÃO GERAL	72
APÊNDICE A – CÁLCULO DO TAMANHO AMOSTRAL.....	73
ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	74

LISTA DE FIGURAS

METODOLOGIA GERAL

Figura 1 – Desenho experimental	6
--	---

RESULTADOS

Artigo I

Figura 1 – Fluxograma da seleção de estudos para revisão sistemática	24
---	----

Artigo II

Figura 1 – Efeito do consumo do óleo de coco sobre o peso corporal e o consumo alimentar dos grupos experimentais	52
Figura 2 – Efeito do consumo de óleo de coco sobre a morfometria do tecido adiposo de ratas <i>Wistar</i>	53
Figura 3 – Efeito do consumo de óleo de coco sobre parâmetros bioquímicos de ratas <i>Wistar</i>	54
Figura 4 – Concentrações de citocinas inflamatórias no tecido adiposo intra-abdominal de ratas <i>Wistar</i>	59
Figura 5 – Efeito do consumo de óleo de coco sobre a concentração das enzimas antioxidantes e a peroxidação lipídica em ratas <i>Wistar</i>	60

LISTA DE TABELAS

METODOLOGIA GERAL

Tabela 1 – Composição centesimal das dietas experimentais.....	5
---	---

RESULTADOS

Artigo I

Tabela 1 – Efeitos do óleo de coco sobre o perfil lipídico em estudos de intervenção	28
---	----

Tabela 2 – Composição nutricional das intervenções dietéticas dos estudos que investigaram os efeitos do óleo de coco sobre o perfil lipídico	30
--	----

Artigo II

Tabela 1 – Composição centesimal das dietas experimentais.....	48
---	----

Tabela 2 – Efeito da substituição da fonte lipídica da dieta por óleo de coco nos parâmetros antropométricos	53
---	----

Tabela 3 – Perfil de ácidos graxos dos óleos utilizados para elaboração das dietas experimentais	55
---	----

Tabela 4 – Efeito da substituição da fonte lipídica da dieta por óleo de coco no perfil lipídico de fígado de ratas <i>Wistar</i>	56
--	----

Tabela 5 – Efeito da substituição da fonte lipídica da dieta por óleo de coco no perfil lipídico dos diferentes tecidos adiposos de ratas <i>Wistar</i>	58
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SFA – Ácidos Graxos Saturados

AGCM – Ácidos Graxos de Cadeia Média

C12:0 – Ácido Láurico

C14:0 – Ácido Mirístico

n – Tamanho amostral

G1 – Grupo 1, dieta controle AIN-93M (4g de óleo de soja/ 100g de dieta)

G2 – Grupo 2, dieta com substituição de 10,4% do total de lipídeos por óleo de coco (0,424g de óleo de coco + 3,58g de óleo de soja/100g de dieta)

G3 – Grupo 3, dieta com substituição de 50% do total de lipídeos por óleo de coco (2,17g de óleo de coco + 2g de óleo de soja/ 100g de dieta)

G4 – Grupo 4, dieta com substituição de 95% do total de lipídeos por óleo de coco (4,12g de óleo de coco + 0,2g de óleo de soja/ 100g de dieta)

% – Porcentagem

p – Probabilidade de significância

C10:0 – Ácido cáprico

IL – Interleucina

IL-1 β – Interleucina-1 β

IL-12 – Interleucina-12

TCM – Triglicerídeos de Cadeia Média

C8:0 – Ácido Caprílico

AGCL – Ácido Graxo de Cadeia Longa

AGL – Ácido Graxo Livre

TCL – Triglicerídeos de Cadeia Longa

α – Poder estatístico

g – Gramas

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

UFV – Universidade Federal de Viçosa

°C – Graus Celsius

AIN – *American Institute of Nutrition*
qsp – Quantidade Suficiente Para
Kcal – Caloria
mL – Mililitro
C16:0 – Ácido Palmítico
C18:0 – Ácido Esteárico
C18:1 – Ácido Oleico
C18:2 – Ácido Linoleico
C18:3 – Ácido Linolênico
MUFA – Ácidos Graxos Monoinsaturados
PUFA – Ácidos Graxos Poli-insaturados
g – Força *g*
PBS – Solução Salina Tamponada com Fosfato
mM – Milimolar
CEA – Coeficiente de Eficácia Alimentar
IMC – Índice de Massa Corporal
cm – Centímetro
mg – Miligramas
 μm – Micrômetros
x – Vezes
TG – Triglicerídeos
CT – Colesterol Total
HDL – Lipoproteína de Alta Densidade
LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade
IFN γ – Interferon γ
TNF α – Fator de Necrose Tumoral α
SOD – Enzima Superóxido Dismutase
Nm – Nanômetro
CAT – Enzima Catalase
MDA – Malondialdeído
TBARS – Ácido Tiobarbitúrico
Apo-AI – Apolipoproteína A-I
Apo-B – Apolipoproteína-B

dL – Decilitro
Kg – Quilograma
VCT – Valor Calórico Total
 Δ – Delta
VLDL – Lipoproteína de Densidade Muito Baixa
DCV – Doença Cardiovascular
a – Estudos Controlados
b – Estudos Não-controlados
CHO – Carboidrato
PTN – Proteína
LIP – Lipídeos
OC – Óleo de Coco
NI – Não Informado
TLR4 – Receptor do Tipo Toll 4

LISTA DE SÍMBOLOS

® – Marca Registrada

♂ – Homens

♀ – Mulheres

↑ – Aumento

↓ – Redução

RESUMO

SIQUEIRA, Nathane Pais, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2016. **Avaliação dos parâmetros metabólicos e imunológicos da substituição da fonte lipídica da dieta por óleo de coco virgem (*Cocos nucifera* L.) em ratas *Wistar***. Orientadora: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Coorientadores: Sérgio Luís Pinto da Matta e Manoela Maciel dos Santos Dias.

O óleo de coco virgem (*Cocos nucifera* L.) apresenta composição diferenciada dos demais óleos, com maiores proporções de ácidos graxos saturados (SFA), sendo a maior parte ácidos graxos de cadeia média (AGCM). Desses, a maior proporção é representada pelo ácido láurico (C12:0), seguida pelo ácido mirístico (C14:0). Essa composição diferenciada está relacionada a diferenças em sua absorção e metabolismo no organismo. Contudo, os estudos não são claros quanto à quantidade desse óleo que deve ser ingerida por dia. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos metabólicos da substituição da fonte lipídica da dieta por óleo de coco virgem em ratas *Wistar*. Foi realizado um experimento laboratorial e foram utilizados 32 animais, aleatoriamente divididos em 4 grupos experimentais (n=8). Durante 10 semanas os animais receberam dietas normolipídicas, que diferiam de acordo com a fonte lipídica utilizada, sendo, G1 – controle AIN-93M, óleo de soja; G2 – substituição de 10,4% do total de lipídeos por óleo de coco; G3 – substituição de 50% do total de lipídeos por óleo de coco; G4 – substituição de 95% do total de lipídeos por óleo de coco. Ao final do período experimental, não foram observadas alterações nos parâmetros antropométricos advindos do consumo de óleo de coco ($p>0,05$), contudo, em G3 houve elevação das concentrações séricas de triglicerídeos, comparado aos demais grupos que receberam óleo de coco ($p=0,004$). Além disso, no tecido hepático dos animais de G4 foram encontrados maiores teores de ácido cáprico (C10:0) e de ácido mirístico, em comparação a G2 ($p=0,002$) e a G1 e a G2 ($p<0,001$), respectivamente. As quantidades de SFA total foram maiores nos grupos G3 e G4, em comparação com os demais grupos

($p=0,002$). Com relação aos diferentes tecidos adiposos, o tecido adiposo intra-abdominal apresentou maiores concentrações de C10:0 em G3 e G4 ($p<0,001$). Nos tecidos adiposos mesentérico e perirrenal, foram observadas maiores concentrações desse ácido graxo em G4, seguido por G3 ($p<0,001$ e $p=0,001$, respectivamente). As quantidades de C14:0 também foram maiores em G3 e G4 nos tecidos adiposos intra-abdominal ($p<0,001$) e perirrenal ($p=0,001$), em comparação aos demais grupos. Já no tecido adiposo mesentérico, esse ácido graxo apresentou-se aumentado em G4, seguido por G3 ($p<0,001$). A quantidade de SFA total foi maior em G4 nos tecidos adiposo intra-abdominal ($p<0,001$), mesentérico ($p=0,008$) e perirrenal ($p=0,005$). O consumo de óleo de coco também elevou as concentrações das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β ($p=0,039$) e IL-12 ($p=0,014$). Além disso, foi possível observar maior atividade da enzima catalase nos grupos que receberam óleo de coco ($p<0,001$) e redução de Malondialdeído em G3, em comparação a G1 ($p=0,021$). Assim, conclui-se que, apesar do consumo de óleo de coco, em uma dieta normolipídica, aumentar a atividade da enzima catalase e reduzir a peroxidação lipídica, a substituição de maiores quantidades dos lipídeos da dieta por óleo de coco pode elevar as concentrações plasmáticas de triglicerídeos, bem como levar ao maior acúmulo de C10:0, C14:0 e SFA total, tanto no fígado quanto nos diferentes tecidos adiposos. Esses resultados, associados ao aumento das concentrações de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo, ressaltam que o consumo desse óleo deve ser realizado com cuidado e atenção e, portanto, mais estudos se fazem necessários para determinação da quantidade adequada a ser consumida.

ABSTRACT

SIQUEIRA, Nathane Pais, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2016. **Evaluation of the metabolic and immunological parameters of replacement the lipid source diet for virgin coconut oil (*Cocos nucifera* L.) in Wistar rats.** Advisor: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Co-advisers: Sérgio Luís Pinto da Matta and Manoela Maciel dos Santos Dias.

Virgin coconut oil (*Cocos nucifera* L.) presents different composition compared to other oils, with higher proportions of saturated fatty acids (SFA), being most of them medium-chain fatty acids (MCFA). The lauric acid (C12:0) represents the largest proportion, followed by myristic acid (C14:0). This different composition is related to differences in their absorption and metabolism in the body. However, the studies are not clear about the amount of this oil should be consumed per day. Thus, the aim of this study was to evaluate the metabolic effects of replacing the fat source of the diet for virgin coconut oil in Wistar rats. A laboratory experiment was conducted using 32 animals randomly divided into 4 experimental groups (n=8). For 10 weeks, the animals received normolipidic diets, which differed according to the lipid source used, being G1 - AIN-93M control soybean oil; G2 - replacing 10.4% of total lipids for coconut oil; G3 - replacement of 50% of total lipids for coconut oil; G4 - replacing 95% of total lipids for coconut oil. At the end of the trial period, no changes were observed in anthropometric parameters arising from coconut oil consumption ($p>0.05$), however, in G3 there was an increase of serum triglycerides, compared to other groups who received coconut oil ($p=0.004$). Furthermore, in liver tissue of animals G4 were found higher capric acid content (C10:0) and myristic acid, in comparison to G2 ($p=0.002$) and G1 and G2 ($p<0.001$), respectively. The total amounts SFA were higher in groups G3 and G4, as compared to the other groups ($p=0.002$). With regard to the different adipose tissue, intra-abdominal adipose tissue showed higher concentrations of C10:0 in G3 and G4 ($p<0.001$). In perirenal and mesenteric adipose tissue were observed higher concentrations of this

fatty acid in G4, followed by G3 ($p<0.001$ and $p=0.001$, respectively). The amounts of C14:0 were also higher in G3 and G4 in intraabdominal adipose tissue ($p<0.001$) and perirenal ($p=0.001$) compared to the other groups. In the mesenteric adipose tissue, this fatty acid was increased in G4, followed by G3 ($p<0.001$). The total amount of SFA was higher at G4 in intraabdominal adipose tissue ($p<0.001$), mesenteric ($p=0.008$) and perirenal ($p=0.005$). The consumption of coconut oil also increased IL-1 β concentrations ($p=0.039$) and IL-12 ($p=0.014$). Furthermore, we observed increased activity of the enzyme catalase in the groups that received coconut oil ($p<0.001$) and reduced malondialdehyde in G3, compared to G1 ($p=0.021$). Thus, we can conclude that although coconut oil consumption in a normolipidic diet increase the catalase enzyme activity and reduce lipid peroxidation, the replacement of higher amounts of dietary lipids of coconut oil may raise plasma concentrations of triglycerides and lead to greater accumulation of C10:0, C14:0 and the total SFA, both in the liver and in the different adipose tissues. These results, associated with increased concentrations of pro-inflammatory cytokines in adipose tissue, point out that the consumption of oil should be carried out with care and attention and therefore more studies are necessary to determine the appropriate amount to be consumed.

1 INTRODUÇÃO

O óleo de coco virgem (*Cocos nucifera L.*) é o resultado de um processamento conhecido como extração úmida, que se dá, inicialmente, pela obtenção do leite de coco fresco, por prensagem, a partir da polpa dos frutos do coco. Em seguida, é produzida uma emulsão que é quebrada, na presença ou ausência de altas temperaturas e sem o uso de produtos químicos^{1, 2}. O processamento com o controle de temperatura é o mais desejável para a obtenção do óleo de coco virgem, uma vez que os compostos que contribuem para seu efeito antioxidante e anti-inflamatório, como os fitoquímicos, polifenóis, tocoferóis e fitoesteróis, e são termicamente instáveis^{2, 4-6}.

Composto, em sua maior parte (cerca de 60 a 63%), por triglicerídeos de cadeia média (TCM), com 8 a 12 átomos de carbono, como os ácidos caprílico (C8:0), cáprico (C10:0) e láurico (C12:0)², esse óleo apresenta, ainda, cerca de 90% de ácidos graxos saturados, sendo a maior proporção desses, 40 a 60 %, representada pelo ácido láurico (C12:0)^{2, 3}.

Com relação ao metabolismo do óleo de coco, o menor tamanho da cadeia carbônica dos ácidos graxos de cadeia média (AGCM), comparado com os ácidos graxos de cadeia longa (AGCL), leva a diferenças de digestão, absorção e metabolismo que podem estar associadas ao menor ganho de peso⁷ relacionado ao consumo desse óleo.

Essa diferença pode ocorrer porque os TCM não necessitam da completa hidrólise no intestino delgado para serem absorvidos, requisitando de uma menor ação da enzima lipase pancreática. Assim, após a absorção, os ácidos graxos livres (AGL) se ligam à albumina e são transportados diretamente ao fígado, através da circulação portal^{8, 9}. No fígado, esses AGL são oxidados mais rapidamente que os AGCL, pois, devido ao pequeno tamanho, não necessitam da enzima carnitina-palmitoil transferase I para seu transporte para o interior das mitocôndrias. Dessa forma, os AGCM oxidados têm sua energia

dissipada na forma de calor, ficando, portanto, menos disponíveis para o depósito no tecido adiposo^{8, 10}.

Além disso, também já foi observado que os TCM poderiam atuar sobre o perfil lipídico, aumentando os níveis de *High-density Lipoprotein* colesterol (HDL-c)¹¹, e sobre as citocinas inflamatórias, ativando as células do sistema imune, principalmente os macrófagos¹².

Dessa forma, hipotetizou-se que o óleo de coco virgem atuaria na redução de peso corporal, devido à sua composição diferenciada em ácidos graxos, com menor incorporação destes nos tecidos, em função da sua oxidação mais rápida no fígado, na melhoria dos parâmetros bioquímicos e na melhora do estado oxidativo, com aumento da atividade das enzimas antioxidantes em ratas *Wistar*.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os parâmetros metabólicos e imunológicos da substituição da fonte lipídica da dieta por óleo de coco virgem (*Cocos nucifera L.*) em ratas *Wistar*.

2.2 Específicos

- ✓ Revisar a literatura científica concernente aos efeitos da ingestão de óleo de coco sobre o perfil lipídico;
- ✓ Avaliar os efeitos da substituição parcial da fonte lipídica da dieta por óleo de coco virgem em relação aos parâmetros antropométricos, bioquímicos, histológicos, inflamatórios e do estresse oxidativo em ratas *Wistar*.

3 METODOLOGIA GERAL

3.1 Experimentação animal

3.1.1 Cálculo amostral

O tamanho amostral foi calculado conforme proposto por Mera e colaboradores¹³, adotando-se uma diferença de 20% no ganho de peso (variável principal) em relação aos animais alimentados com triglicerídeos de cadeia longa (TCL) e TCM¹⁰ e um poder estatístico de 98% ($\alpha=2\%$), resultando em 8 animais por grupo experimental (Apêndice A). Para os cálculos foram utilizados os valores de *baseline* do estudo de Geliebter e colaboradores¹⁰. A escolha do ganho de peso corporal como variável principal baseou-se no fato desse ser o principal resultado esperado a partir da suplementação com o óleo de coco virgem.

3.1.2 Modelo animal

Foram utilizadas trinta e duas ratas fêmeas da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*, Rodentia), adultas, com peso médio de $217 \pm 11,7$ g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Viçosa.

3.1.3 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV), sob o número de protocolo 99/2014 (Anexo A).

3.1.4 Desenho experimental

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, com ciclo de claro/escuro de 12 horas e temperatura média de 22 ± 2 °C, durante todo o período experimental. Inicialmente, os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n=8), de forma que a média de peso inicial dos grupos fosse semelhante.

As dietas experimentais foram formuladas de acordo com as recomendações AIN-93M, propostas pelo *American Institute of Nutrition*¹⁴ para manutenção de animais adultos. Para confecção dessas dietas houve a substituição parcial da fonte lipídica, em diferentes concentrações, por óleo de coco virgem, de forma que as mesmas se mantivessem isocalóricas (Tabela 1). Assim, foi formulada uma dieta controle AIN-93M (4g de óleo de soja/ 100g de dieta, G1); uma dieta com 10,4% de óleo de coco (0,424g de óleo de coco + 3,58g de óleo de soja/100g de dieta, G2); uma dieta com 50% de óleo de coco (2,17g de óleo de coco + 2g de óleo de soja/ 100g de dieta, G3); uma dieta com 95% de óleo de coco (4,12g de óleo de coco + 0,2g de óleo de soja/ 100g de dieta, G4) (Figura 1).

Tabela 1 – Composição centesimal das dietas experimentais

Ingredientes**	Grupos Experimentais			
	1	2	3	4
Amido de milho (qsp*)	46,57	46,57	46,57	46,57
Caseína (>85% de proteína)	14	14	14	14
Amido dextrinizado	15,5	15,5	15,5	15,5
Açúcar refinado	10	10	10	10
Óleo de Soja	4	3,58	2	0,2
Óleo de Coco	0	0,424	2,17	4,12
Celulose	5	5	5	5
Mix mineral	3,5	3,5	3,5	3,5
Mix vitamínico	1	1	1	1
L-cistina	0,18	0,18	0,18	0,18
Bitartarato de Colina	0,25	0,25	0,25	0,25
Peso final	100	100,004	100,17	100,32
Kcal total	376,6	376,6	376,6	376,6

Dietas baseadas na recomendação AIN-93M¹⁴. **Dietas (g/100 g); *qsp = quantidade suficiente para; g = gramas; Kcal = Calorias.

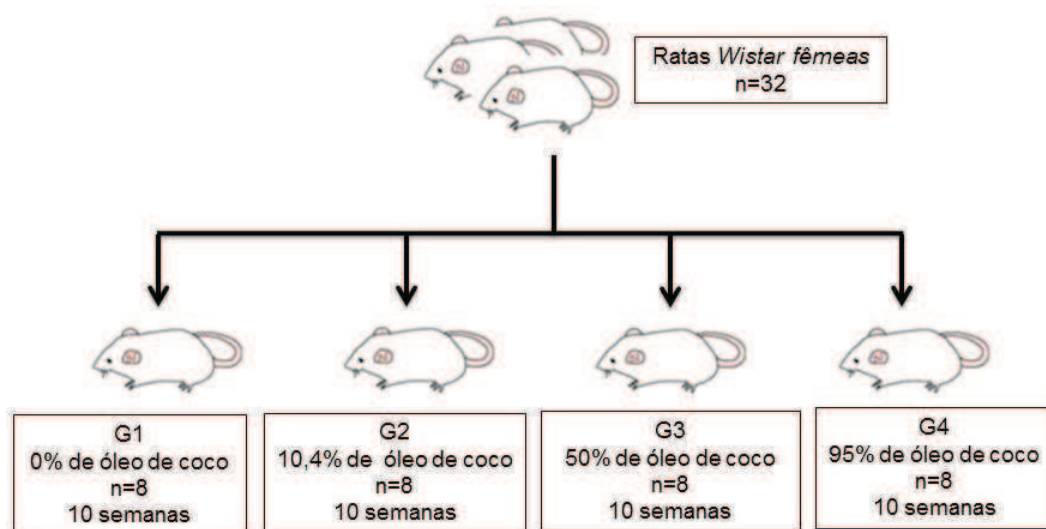


Figura 1 – Desenho experimental.

O cálculo energético da dieta foi realizado com base nos valores calóricos de cada óleo, para tanto, considerou-se que um mL de um óleo fonte de TCL, como o óleo de soja, fornece 9,2 Kcal, enquanto um mL de um óleo fonte de TCM, como o óleo de coco, fornece 8,3 Kcal¹⁵,
16.

A menor concentração de óleo de coco nas dietas experimentais (G2, substituição de 10,4% do total de lipídeos por óleo de coco) foi estabelecida a partir da média de recomendação dos fabricantes desse óleo para consumo humano por dia, que é de 15 a 30 mL/dia. Foi realizado o cálculo de conversão dos valores recomendados para roedores, mantendo-se a proporcionalidade para humanos. Em seguida, foi definida a maior concentração de óleo de coco a ser ofertada (G4, substituição de 95% do total de lipídeos por óleo de coco), sendo essa, baseada no máximo de substituição do óleo de soja por óleo de coco que pode ser realizada sem causar prejuízo à saúde dos animais, em função da necessidade do fornecimento de ácidos graxos essenciais¹⁰. Por fim, determinou-se que um grupo (G3, substituição de 50% do total de lipídeos por óleo de coco) receberia metade do total de lipídeos de cada um dos óleos.

As dietas foram confeccionadas na forma de *pellets* e foram armazenadas protegidas da luz, em temperaturas de 0 a 4°C, até o

momento da sua utilização. Os animais receberam água destilada e dieta *ad libitum*, por dez semanas.

3.2 Óleos testes

O óleo de coco virgem utilizado no experimento foi fornecido pela empresa Dr. Orgânico[®] (Porto Feliz, Brasil) por meio de doação, já o óleo de soja (Soya, BUNGE[®], Brasil) foi adquirido do comércio local.

O perfil de ácidos graxos dos óleos utilizados neste estudo foi determinado no Laboratório de Bioquímica Nutricional do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Para tanto, utilizou-se a metodologia de Hartman e Lago¹⁷ para saponificação e esterificação dos óleos. As amostras foram analisadas em cromatógrafo a gás (Shimadzu[®], modelo CG-17/ Class, Japão) equipado com detector de ionização e coluna cromatográfica capilar de sílica fundida SP-2560 (biscianopropil polysiloxane SP-2560) de 100 metros de comprimento e 0,25 mm de diâmetro, conforme descrito por Rosa e colaboradores¹⁸. Para tanto, utilizou-se a seguinte programação de leitura: temperatura inicial de 50°C, com rampa de aquecimento de 10°C por minuto até alcançar 150°C e, em seguida, 4°C por minuto até alcançar a temperatura de 250°C. A temperatura do injetor foi mantida a 240°C e detector a 260°C. O gás de arraste foi o hidrogênio ultra puro, razão *split*:5 e fluxo da coluna de 1,6 mL/min. A identificação e quantificação dos ácidos graxos presentes nas amostras foram realizadas pela comparação do tempo de retenção das amostras com o padrão de mistura de ácidos graxos (FAME – SupelcoTM de C 4:0 à C 24:0, Sigma-Aldrich[®], EUA), sendo os resultados expressos em percentual.

3.3 Eutanásia e dissecação dos órgãos

Ao final do período experimental, os animais foram eutanasiados no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, em ambiente tranquilo e adequado, longe da sala de experimentação. O procedimento foi

realizado por médico veterinário e uma equipe de apoio devidamente treinada.

Após serem submetidos a um jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados de 3 a 5 minutos com isoflurano, a 3% (Cristália[®], Brasil), utilizando circuito simples com fluxômetro, acoplado a um cilindro de oxigênio.

Para tanto, os roedores foram acondicionados individualmente em caixas transparentes vedadas, para saturação do anestésico, ampliando, assim, os efeitos de sedação e de anestesia profunda. Foram avaliados os parâmetros fisiológicos e os reflexos para averiguação do grau de sensibilidade da anestesia para que, enfim, os animais fossem submetidos à exsanguinação total.

O sangue foi coletado por incisão na aorta abdominal em tubos sem heparina que, posteriormente, foram centrifugados a 704g, por 10 minutos (modelo Z216MK, Hermle[®], Alemanha). O soro foi retirado e armazenado a -80 °C para análises posteriores.

Os tecidos adiposos intra-abdominal, mesentérico e perirrenal também foram congelados a -80 °C para análises posteriores. Além disso, uma pequena porção do tecido adiposo intra-abdominal foi lavada com solução salina tamponada com fosfato 10mM (PBS) e fixada em solução de formalina de Carson¹⁹ tamponada com 1% de cálcio para as análises histológicas.

3.4 Avaliação da ingestão alimentar e das medidas corporais

3.4.1 Consumo alimentar

A ingestão alimentar foi monitorada pela diferença, em gramas, entre a quantidade de dieta ofertada e a quantidade restante nos comedouros e as sobras no fundo da gaiola, pesados semanalmente durante todo o período experimental.

3.4.2 Medidas corporais

O peso dos animais foi verificado semanalmente (Mettler Toledo[®], Brasil), sendo que o peso final de cada animal foi subtraído do

peso inicial para determinação do ganho de peso. Ainda, a relação entre o ganho de peso (g) e a ingestão alimentar foi utilizada para o cálculo do coeficiente de eficácia alimentar (CEA).

Ao início e ao final do experimento, foram aferidos os perímetros abdominal (imediatamente após as pernas dianteiras) e torácico (imediatamente antes das pernas traseiras) e, posteriormente, foram calculadas as diferenças destas circunferências.

Adicionalmente, foi calculado o Índice de Massa Corporal (IMC), a partir da divisão do peso corporal (g) pelo quadrado do comprimento focinho-ânus (cm)²⁰. Apesar deste índice não apresentar nível classificatório para animais, os valores mais elevados revelam maior propensão para índices de adiposidade maiores.

3.5 Contagem e morfometria de adipócitos

As células do tecido adiposo intra-abdominal foram mensuradas de acordo com Boqué e colaboradores²¹. Para tanto, aproximadamente 30mg desse tecido adiposo, foram desidratados em gradientes crescentes de etanol (70% à 100%) e incluídos em Paraplast Plus (Sigma[®], Suíça).

A seguir, secções transversais de 5µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo (modelo CUT 4055, Olympus[®], EUA). Os cortes foram fixados em lâminas de vidro, corados com hematoxilina e eosina²² e montados em Entellan (Merck[®], Alemanha). As análises foram realizadas no Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa.

Para as análises histológicas, dez imagens por animal (80 imagens por grupo) foram capturadas utilizando-se o microscópio Primo Star 2012 (Zeiss[®], Alemanha), com câmera fotográfica acoplada (Aixo ERc5s, Zeiss[®], Alemanha), ampliação total de 200x (10x de lentes oculares e 20x lentes objetivas) e com 2048x1024 *pixels* de resolução. Essas imagens foram analisadas no *software* Adiposoft (Adiposoft from CIMA, University of Navarra), validado por Galarraga e

colaboradores²³, para determinar o número de adipócitos e a área de cada célula.

Para a mensuração da área, utilizou-se o fator de calibração no Adiposoft igual a 0.17, sendo que apenas os adipócitos que apresentavam os contornos bem definidos e que estavam completos no campo da foto foram medidos. Para a contagem dos adipócitos, também só foram considerados aqueles que apresentassem contornos bem definidos e que estavam completos no campo da foto. Posteriormente, determinou-se a área de cada foto, utilizando-se o programa Image-Pro Plus (área da foto=141164,2 μ^2), sendo o número de adipócitos contado e expresso pela área da foto.

3.6 Análises Bioquímicas

Alíquotas de soro foram utilizadas para as análises de glicose, triglicerídeos (TG), colesterol total (CT) e HDL-colesterol (HDL-c), por métodos enzimáticos colorimétricos, utilizando-se kits comerciais (Bioclin[®], Brasil), e o aparelho BS200 (Mindray[®], China). Para determinação da fração de LDL-colesterol (LDL-c) foi realizado o cálculo, segundo a equação de Friedewald e colaboradores²⁴: $LDL-c = (CT - HDL-c) - (TG/5)$. As análises foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa.

3.7 Avaliação da incorporação de ácidos graxos nos tecidos adiposo intra-abdominal, adiposo mesentérico e adiposo perirrenal e no fígado

A avaliação da incorporação de ácidos graxos teciduais foi realizada no Laboratório de Bioquímica Nutricional do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, por meio da determinação do perfil lipídico dos tecidos adiposos intra-abdominal, mesentérico e perirrenal, bem como do fígado.

Para tanto, os ácidos graxos dos tecidos foram extraídos, segundo o método de Folch e colaboradores²⁵, de 30mg de cada tecido adiposo e de 100 mg de fígado.

Posteriormente, esses foram saponificados e esterificados, segundo metodologia proposta por Hartman e Lago¹⁷. Em seguida, as amostras foram ressuspensas em 600µL de hexano e injetadas em cromatógrafo a gás (Shimadzu[®], modelo CG-17/ Class, Japão), equipado com detector de ionização e coluna cromatográfica capilar de sílica fundida (biscianopropil polysiloxane SP-2560) de 100 metros de comprimento e 0.25 mm de diâmetro¹⁸. Para os tecidos adiposos, a temperatura inicial de leitura utilizada foi de 120°C por 2 minutos e a temperatura final de 240°C, com taxa de aquecimento de 8°C/minuto²⁶. Para o fígado, a temperatura inicial de leitura foi 140°C por 5 minutos e a temperatura final 240°C, com taxa de aquecimento de 4°C/minuto¹⁸.

Para identificação dos ácidos graxos nas amostras foi realizada a comparação do tempo de retenção das amostras com o padrão de mistura de ácidos graxos (FAME – SupelcoTM de C4:0 à C24:0, Sigma-Aldrich[®], EUA), sendo os resultados expressos em percentual.

3.8 Citocinas inflamatórias

Para dosagem das citocinas inflamatórias interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-12 (IL-12), interferon γ (IFN γ) e fator de necrose tumoral α (TNF α) utilizou-se 100mg de tecido adiposo intra-abdominal de cada animal, homogeneizados com tampão fosfato 50 mM (pH 7,0) adicionado com Tween-20 a 0,05% e aprotinina à 5mg/mL. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 8000g (modelo Z216MK, Hermle[®], Alemanha) a 4 °C, por 5 minutos e os sobrenadantes retirados. Essa extração foi realizada no Laboratório de Bioquímica Nutricional do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, em seguida, as amostras foram enviadas ao Laboratório Especializado em Análises Científicas (LEAC, São Paulo), acondicionadas em quantidade adequada de gelo seco (conforme instruções do laboratório), onde o ensaio foi realizado.

A técnica utilizada foi a de xMAP (MAP=*Multiple Analyte Profiling*, x=citocinas), a qual envolve um processo capaz de corar microesferas magnéticas com dois fluorocromos espectrais distintos. Cada esfera apresenta uma “assinatura” baseada em “código de cor”. Assim, o analito se liga, por meio de ligações covalentes não reversíveis, aos anticorpos de captura localizados na superfície das microesferas. A detecção é feita através de um terceiro marcador fluorescente, ficoeritrina, ligada ao anticorpo de detecção. O kit utilizado foi RECYT-65K-04 (IL-1 β , IL-12p70, IFN γ e TNF α , Millipore[®], Alemanha) que utiliza essas microesferas como base dos imunoenensaio multiplex e dosa todas citocinas simultaneamente. Assim, cada esfera é conjugada a um anticorpo analito específico e são lidas no equipamento Luminex, através de sistema duplo de *lasers*. Um feixe de *laser* detecta a microesfera (o código de cor específico para o ensaio) e o outro *laser* quantifica o sinal de *reporter* em cada microesfera. As concentrações mínimas de detecção desse kit são de 2,8 pg/mL para IL-1 β , de 3,3 pg/mL para IL-12, de 6,2 pg/mL para IFN γ e de 1,9 pg/mL para TNF α .

3.9 Atividade das enzimas antioxidantes

Para determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), amostras de 100 mg de fígado dos animais foram homogeneizadas com tampão fosfato 50 mM (pH 7,0) e centrifugadas a 11269g (modelo Z216MK, Hermle[®], Alemanha) a 4 °C, por 10 minutos, sendo o sobrenadante resultante utilizado para a mensuração da atividade dessa enzima. Para tanto, utilizou-se metodologia adaptada de Dieterich e colaboradores²⁷, a qual baseia-se na habilidade da SOD de retirar o superóxido do meio, diminuindo, assim, a razão de auto-oxidação do pirogalol (Sigma-Aldrich[®], EUA), utilizando-se leituras em espectrofotômetro (Multiskan GO, Thermo Scientific[®], Finlândia), a 570 nm.

Para determinar a atividade da enzima catalase (CAT), amostras de 100 mg de fígado dos animais foram maceradas com tampão

fosfato 50 mM (pH 7,0) com 1% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich[®], EUA). O homogenato resultante foi, em seguida, centrifugado a 1956g (modelo Z216MK, Hermle[®], Alemanha) a 4° C, por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi utilizado para mensuração da atividade enzimática, que é determinada pela taxa de decaimento do peróxido de hidrogênio lido em espectrofotômetro (Multiskan GO, Thermo Scientific[®], Finlândia), a 240nm²⁸. As análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Nutricional do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa.

3.10 Avaliação da peroxidação lipídica

Conforme metodologia proposta por Buege e Aust²⁹, foi determinada a capacidade do malondialdeído (MDA), um produto secundário da peroxidação lipídica, de reagir com o ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Para tanto, 100mg do tecido hepático foi homogeneizado com tampão fosfato 50 mM (pH 7,0) e centrifugados a 958g (modelo Z216MK, Hermle[®], Alemanha), por 10 minutos. Ao sobrenadante resultante foi acrescentada a solução de TBARS, que continha ácido tricloroacético (Sigma-Aldrich[®], EUA) e ácido tiobarbitúrico (Merck[®], Alemanha), sendo a reação mantida em banho-maria, a 100°C por 10 minutos.

Em seguida, as amostras foram novamente centrifugadas a 958g (modelo Z216MK, Hermle[®], Alemanha), por 10 minutos, e o sobrenadante foi utilizado para a mensuração espectrofotométrica (Multiskan GO, Thermo Scientific[®], Finlândia), a 535 nm.

Para o cálculo da concentração de TBARS no homogenato, o coeficiente de extinção molar de $1,56 \times 10^5$ M/cm foi utilizado, sendo, a concentração final expressa em micromol/mg de proteína. As análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Nutricional do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa.

3.11 Dosagem de proteínas

A quantidade de proteína presente nas amostras de tecido hepático utilizadas nas análises de CAT, SOD e TBARS foi mensurada segundo metodologia de Lowry e colaboradores³⁰, no Laboratório de Bioquímica Nutricional do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, para que os resultados pudessem ser normalizados pela concentração de proteínas dos tecidos.

O princípio do método consiste na hidrólise alcalina das proteínas da amostra e na formação de um complexo de cor azul, a partir da reação com o reagente de Folin Ciocalteu (Sigma-Aldrich[®], EUA). Assim, a intensidade da coloração desse complexo é proporcional à concentração de proteína da amostra. Para a determinação da concentração, foi utilizada uma curva padrão de proteína com solução de albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich[®], EUA). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Multiskan GO, Thermo Scientific[®], Finlândia), a um comprimento de onda de 700nm.

3.12 Análises estatísticas

A normalidade das variáveis foi determinada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e, em seguida, as variáveis foram submetidas à análise de variância. As comparações entre os quatro grupos foram realizadas pela análise de variância, ANOVA *one way*, seguida do teste *post hoc* de Tukey para dados com distribuição normal, enquanto que, para os dados não paramétricos, foi aplicado o teste de Kruskal Wallis complementado pelo teste de comparações múltiplas de Dunn's. O processamento e análise estatística dos dados foram realizados utilizando o *software* SPSS, versão 20 para *Windows* (SPSS INC. Chicago, IL. USA), considerando $\alpha=5\%$. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão para resultados com distribuição normal e mediana \pm intervalo interquartilico para resultados não paramétricos.

4 REFERÊNCIAS

1. Hamsi MA, Othman F, Das S, Kamisah Y, Thent ZC, Qodriyah HMS, et al. Effect of consumption of fresh and heated virgin coconut oil on the blood pressure and inflammatory biomarkers: An experimental study in Sprague Dawley rats. *Alexandria Journal of Medicine*. 2015;51:53-63.
2. Marina AM, Mana YBC, Amin I. Virgin coconut oil: emerging functional food oil. *Trends in Food Science & Technology*. 2009;20:481-7.
3. Luo L, Xue M, Vachot C, Geurdenc I, Kaushik S. Dietary medium chain fatty acids from coconut oil have little effects on postprandial plasma metabolite profiles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 2014;420(421):24-31.
4. Logeswari P, Kumar VD, Usha PTA, Kumar P. In vivo antiinflammatory effect of emu oil (*Dromais Novaehollandiae*) and virgin coconut oil (*Cocos Nucifera*) on phorbol ester induced acute inflammatory model. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2014;5(3):896-9.
5. Krishna G, Raj G, Bhatnagar AS, Kumar P, Chandrashekar P. Coconut Oil: Chemistry, Production and Its Applications - A Review. *Indian Coconut Journal*. 2010:15-27.
6. Seneviratne KN, Hapuarachchi CD, Ekanayake S. Comparison of the phenolic-dependent antioxidant properties of coconut oil extracted under cold and hot conditions. *Food Chemistry*. 2009;144:1444–9.
7. Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, Funayama K, Miyashita K. Effect of Medium-chain Triacylglycerols on Anti-obesity Effect of Fucoxanthin. *Journal of Oleo Science*. 2007;56(12):615-21.
8. Ferreira L, Lisenko K, Barros B, Zangeronimo M, Pereira L, Sousa R. Influence of medium-chain triglycerides on consumption and weight gain in rats: a systematic review. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2014;98:1-8.
9. DebMandal M, Mandal S. Coconut (*Cocos nucifera* L.: *Arecaceae*): In health promotion and disease prevention. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2011:241-7.
10. Geliebter A, Torbay N, Bracco EF, Hashim SA, Itallie TBV. Overfeeding with medium-chain triglyceride diet results in diminished deposition of fat. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1983;37:1-4.

11. Nevin KG, Rajamohan T. Beneficial effects of virgin coconut oil on lipid parameters and in vitro LDL oxidation. *Clinical Biochemistry*. 2004;37:830–5.
12. Lim W-S, Gan M-S-Y, Ong M-H-L, Chew C-H. Lauric acid abolishes interferon-gamma (IFN-g)-induction of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression in human macrophages. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. 2015:1-5.
13. Mera R, Thompson H, Prasada C. How to Calculate Sample Size for an Experiment: A Case-Based Description. *Nutrional Neuroscience*. 1998;1(1):87-91.
14. REEVES PG, NIELSEN FH, FAHEY GC. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *American Institute of Nutrition*. 1993;123:1939-51.
15. Bach AC, Frey A, Lutz O. Clinical and Experimental Effects of Mediumchain-triglyceride-based Fat Emulsions-A Review. *Clinical Nutrition*. 1989;8:223-35.
16. Hoagland R, Snider GG. Digestability of certain higher saturated fatty acids and triglycerides. *Journal of Nutrition*. 1943;26(3):219–25.
17. Hartman I, Lago RCA. Rapid preparation of fatty acid methyl ester from lipids. *Londres Laboratory Practice*. 1973;22:475-6.
18. Rosa DD, Lourenço FC, Fonseca ACMd, Sales RLd, Ribeiro SMR, Neves CA, et al. Fish Oil Improves the Lipid Profile and Reduces Inflammatory Cytokines in Wistar Rats With Precancerous Colon Lesions. *Nutrition and Cancer*. 2012:1-11.
19. Carson FL, Martin JH, Lynn JA. Formalin Fixation for Electron Microscopy: A Re-evaluation. *Am J Clin Pathol*. 1973;59:365-73.
20. Crispel Y, Katz O, Ben-Yosef D, Hochberg Ze. Effects of breastfeeding on body composition and maturational tempo in the rat. *BMC Medicine*. 2013;11(114):1-9.
21. Boqué N, Campión J, Paternain L, García-Díaz DF, Galarraga M, Portillo MP, et al. Influence of dietary macronutrient composition on adiposity and cellularity of different fat depots in Wistar rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 2009;65(4):387-96.
22. Díaz-Villaseñor A, Granados O, González-Palacios B, Tovar-Palacio C, Torre-Villalvazo I, Olivares-García V, et al. Differential

modulation of the functionality of white adipose tissue of obese Zucker (fa/fa) rats by the type of protein and the amount and type of fat. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2013;24:1798-809.

23. Galarraga M, Campión J, Muñoz-Barrutia A, Boqué N, Moreno H, Martínez JA, et al. Adiposoft: automated software for the analysis of white adipose tissue cellularity in histological sections. *Journal of Lipid Research*. 2012;53:2791–6.

24. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*. 1972;18(6):499-502.

25. Folch J, Lees M, Stanley GHS. A Simple Method For The Isolation And Purification Of Total Lipides From Animal Tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. 1956:497-509.

26. Han J, Hamilton JA, Kirkland JL, Corkey BE, Guo W. Medium-Chain Oil Reduces Fat Mass and Down-regulates Expression of Adipogenic Genes in Rats. *Obesity Research*. 2003;11(6):734-44.

27. Dieterich S, Bieligg U, Beulich K, Hasenfuss G, Prestle J. Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart - Increased Expression of Catalase in the End-Stage Failing Heart. *Circulation*. 2000;101:33-9.

28. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods of Enzymology*. 1984;105:121-7.

29. Buege JA, Aust SD. In *Methods Enzymol*. New York, Academic Press. 1978:302-10.

30. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall ARJ. Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 1951;193:265-75.

5 RESULTADOS

5.1 Artigo I: Efeitos do consumo de óleo de coco sobre o perfil lipídico em humanos: uma revisão sistemática

5.1.1 Resumo

Nos últimos anos, o conhecimento dos benefícios advindos do consumo de óleo de coco tem aumentado. Contudo, a associação entre o consumo desse óleo e alterações no perfil lipídico ainda merecem atenção. Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi conduzir uma revisão sistemática para avaliar a evidência científica concernente aos efeitos da ingestão de óleo de coco sobre o perfil lipídico. Para tanto, foi realizada uma pesquisa nas bases de dados Science Direct, PubMed e Scopus até abril de 2016. Foram incluídos estudos de intervenção realizados com humanos que comparassem os efeitos do consumo de óleo de coco sobre os parâmetros bioquímicos com outras fontes lipídicas. A partir da literatura pesquisada, foram identificados 4725 artigos, dos quais 13 foram incluídos nesse estudo. A metodologia desses artigos foi classificada com base em critérios de qualidade. Além desses artigos, uma referência adicional de outra base de dados foi incluída, devido à sua relevância. As análises dos resultados foram realizadas de forma subjetiva e em relação às características dos óleos de comparação, aos tempos de tratamento e às características dos voluntários dos estudos, das dietas consumidas e dos óleos de coco ingeridos. Foi possível concluir que não há um consenso com relação aos efeitos do consumo de óleo de coco sobre o perfil lipídico, tendo sido observado tanto o aumento das concentrações de colesterol total e LDL, quanto o aumento de HDL após seu consumo. Assim, mais estudos envolvendo essa temática se fazem necessários.

Palavras-chaves: óleo de coco, consumo, perfil lipídico.

5.1.2 Abstract

In recent years the consumption of coconut oil has increased due to spreading knowledge of its benefits. However, the association between the consumption of this oil and changes in the lipid profile also has begun to attract attention. The objective of this study was to conduct a systematic review to investigate the effects of coconut oil on the lipid profile. Science Direct, PubMed and Scopus databases were searched until April 2016 and supplemented by an additional reference relevant. Human intervention trials with the objective of investigating independent effects of coconut oil on lipid concentrations were included. From the literature search, 4725 publications were screened and 13 studies were included in this study. These papers received a rating based upon the methodology as it appeared in the publication. The analysis was performed in relation to characteristics of the oils compared, to treatment times and to characteristics of the volunteer studies, the consumed diets eaten and the coconut oils. In conclusion, there is no consensus regarding the effects of the consumption of coconut oil on the lipid profile, having been observed both the increase in total cholesterol and LDL, increasing HDL as after consumption. Thus, further studies involving the issue are needed.

Keywords: coconut oil, consumption, lipid profile.

5.1.3 Introdução

Nos últimos anos, tem sido recomendada a substituição de dietas com altas concentrações de ácidos graxos saturados (SFA) por dietas com maiores quantidades de lipídeos insaturados, como fontes de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) e de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), para melhora do perfil lipídico¹. Assim, ocorreria uma redução nas concentrações séricas de Colesterol Total (CT), Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL), Triglicerídeos (TG)², Apolipoproteína A-I (Apo-AI) e Apolipoproteína-B (Apo-B)³.

Além disso, o consumo de elevadas quantidades de ácido láurico (C12:0) poderia, também, levar ao aumento do colesterol sérico, quando comparado ao consumo de MUFA, como o oleico (C18:1)⁴.

Nesse sentido, o óleo de coco (*Cocos nucifera L.*), por possuir composição diferenciada dos demais óleos, com maiores concentrações de ácidos graxos saturados de cadeia média, principalmente de ácido láurico⁵, deve ser utilizado com cautela⁴.

No entanto, os efeitos do consumo desse óleo sobre os parâmetros bioquímicos ainda são controversos. Estudos, tanto em humanos^{6, 7} quanto em animais⁸, apresentaram resultados benéficos do consumo de óleo de coco, apesar da sua alta concentração de SFA. Esse fato estaria relacionado à composição desse óleo, que apresenta quantidades significativas de fitoquímicos, como polifenóis, tocoferóis e fitoesteróis⁵, o que pode contribuir para elevação da Lipoproteína de Alta Densidade (HDL)⁷.

Dessa forma, o objetivo dessa revisão sistemática foi avaliar a evidência científica concernente aos efeitos da ingestão de óleo de coco sobre o perfil lipídico total de humanos.

5.1.4 Metodologia

Essa revisão sistemática foi conduzida segundo as recomendações do guia *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*⁹. Foram selecionados artigos relevantes publicados até 07 de abril de 2016 nas bases de dados Science Direct

(<http://www.sciencedirect.com/science/search>), PubMed
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/advanced>) e Scopus
(<https://www.scopus.com/>), utilizando-se a combinação dos seguintes
descritores: “*Coconut oil*”, ou “*Coconut fat*”, ou “*Lauric acid*” e
“*Cholesterol*”, ou “*Triglycerides*”, ou “*LDL cholesterol*”, ou “*LDL*”, ou
“*HDL cholesterol*”, ou “*HDL*”, ou “*VLDL cholesterol*”, ou “*VLDL*”, ou
“*Hypercholesterolemia*”, ou “*Lipoproteins*”, ou “*Hypertriglyceridemia*”, ou
“*Dyslipidemia*”, ou “*Lipid profile*”, ou “*Cardiovascular disease*”, ou
“*Plasma lipids*”, ou “*Apolipoprotein*”.

Os artigos foram incluídos neste estudo caso apresentassem dados originais de estudos de intervenção realizados com humanos; caso comparassem os efeitos do consumo de óleo do coco sobre os valores (média \pm desvio padrão) de pelo menos um dos parâmetros bioquímicos de interesse (Colesterol Total, LDL colesterol, HDL colesterol e Lipoproteína de Densidade Muito Baixa – VLDL colesterol) ao final da intervenção; caso o tempo de intervenção fosse de, no mínimo, quatro semanas; caso fossem publicados na língua inglesa.

Assim, para a pesquisa dos artigos, em cada base de dados foram adicionadas as combinações dos descritores e, em seguida, foram selecionados filtros, buscando-se apenas os artigos de interesse. Dessa forma, no Science Direct utilizaram-se os filtros “*Journals*”, “*All*” e “*All Science*”; no PubMed “*Clinical Trial*”, “*Humans*” e “*English*”; e no Scopus “*Human*”, “*Article*”, “*Journal*” e “*English*”. Em seguida, os artigos foram avaliados segundo a presença dos descritores como palavras-chaves e a disponibilidade de acesso. Após avaliação dos títulos e resumos, os artigos foram selecionados. Por fim, os artigos duplicados, que apresentaram metodologia inadequada, por não permitirem as conclusões apresentadas, ou que não avaliaram o efeito independente do óleo de coco, foram excluídos.

Os estudos incluídos foram, então, avaliados em relação à qualidade metodológica¹⁰, por meio da escala de pontuação adaptada de Mukuddem-Petersen¹¹ com os seguintes critérios: 1) “O estudo é controlado?”; 2) “Houve randomização?”; 3) “Tamanho amostral

justificado (mínimo de 20 voluntários/ grupo ou cálculo do poder do estudo)?”; 4) “Houve boa adesão aos tratamentos nos estudos?”; 5) “O estudo é cego?” (considerado cegamento simples ou duplo); 6) “Grupos semelhantes no *baseline*?”; 7) “Presença de *washout* ou *run in*?” (para estudos do tipo *crossover*). Por fim, foram excluídos trabalhos em caso de indisponibilidade de acesso, após contato sem sucesso com os autores, e em caso de inadequação da metodologia utilizada.

A pontuação da qualidade das publicações foi determinada somando-se 1 ponto para cada resposta negativa para os critérios supracitados. Dessa forma, atribuiu-se pontuação 0 para aqueles artigos que apresentaram melhor qualidade metodológica; 1 caso o estudo fosse controlado, mas dois critérios não estivessem presentes; 2 caso o estudo não fosse controlado ou 3 critérios não fossem atendidos; e 3 caso 4 ou mais critérios não fossem atendidos.

Para expressar os resultados, além do número pontuado, foi adicionada a letra *a* para estudos controlados e *b* para não controlados. Estudos que receberam a pontuação 3 não foram considerados para elaboração das conclusões desta revisão¹¹. Essa análise foi realizada de forma subjetiva, não sendo utilizada, portanto, estatística formal para definir as diferenças entre os estudos. Toda a pesquisa, análise, seleção e classificação dos artigos foi realizada por 3 pesquisadores diferentes e os desacordos foram resolvidos por consenso.

5.1.5 Resultados

Inicialmente, 4724 artigos foram selecionados nas bases de dados, sendo 96 no Science Direct, 4365 no PubMed e 263 no Scopus. Um artigo não identificado na pesquisa nas bases de dados foi incluído devido à sua relevância. Após análise dos critérios de inclusão, 621 foram considerados elegíveis e, após exclusão dos trabalhos que não apresentaram os descritores nas palavras-chaves (n=559) e que estavam indisponíveis para acesso (n=8), 54 artigos foram avaliados. Após leitura dos textos na íntegra, 13 artigos foram incluídos nesta

revisão sistemática (Figura 1). Desses, 12 artigos receberam pontuação de qualidade <3 e foram utilizados para análises dos resultados.

Na Tabela 1 estão resumidos os estudos de intervenção dietética que investigaram os efeitos do consumo de óleo de coco sobre o perfil lipídico¹²⁻²⁴. Observa-se que a maioria (n=7) dos estudos^{13, 14, 16, 19, 21-23} incluiu mais de 20 voluntários/grupo. Ainda, nota-se que os desenhos experimentais dos estudos são variados, bem como o tempo de intervenção e as características dos voluntários. Além disso, o tipo e a quantidade de lipídeos totais das dietas, bem como o tipo e a quantidade de óleo de coco consumidos também foram diferentes (Tabela 2).

Os efeitos do óleo de coco foram comparados aos efeitos de óleos fontes de PUFA^{12, 13, 16, 17, 19, 21, 22, 24}, de MUFA¹⁴ e de outras fontes de SFA^{12, 14-16, 18, 19} (Tabela 1), sendo que apenas 1 estudo²³ não especificou a fonte lipídica utilizada para comparação.

Considerando os óleos fontes de PUFA, os efeitos do óleo de coco foram comparados aos óleos de cártamo^{12, 16, 19}, de soja^{13, 22} e de canola¹⁷. Assim, foi possível observar que o consumo do óleo de coco elevou as concentrações de CT sérico em relação a esses três óleos (17,6±8,22 mg/dL^{12, 16, 19}, 35,9±15,7 mg/dL¹³ e 20,2±21,2 mg/dL¹⁷, respectivamente), de LDL em relação aos óleos de cártamo e canola (14,3±5,0 mg/dL^{12, 16, 19} e 17,3±18,5 mg/dL¹⁷, respectivamente) e de TG apenas em relação ao óleo de cártamo (6±3,7 mg/dL)¹².

Em relação ao consumo de azeite de oliva extra virgem, fonte de MUFA, os mesmos resultados foram encontrados, porém em maior magnitude do que quando comparado aos óleos fontes de PUFA (38±34 mg/dL de CT, 31±34,5 mg/dL de LDL, 15,5±69,5 mg/dL de TG e 4±8 mg/dL de HDL)¹⁴. Esses resultados sugerem que o consumo do óleo de coco exibe efeito prejudicial sobre o perfil lipídico em comparação aos ácidos graxos insaturados.

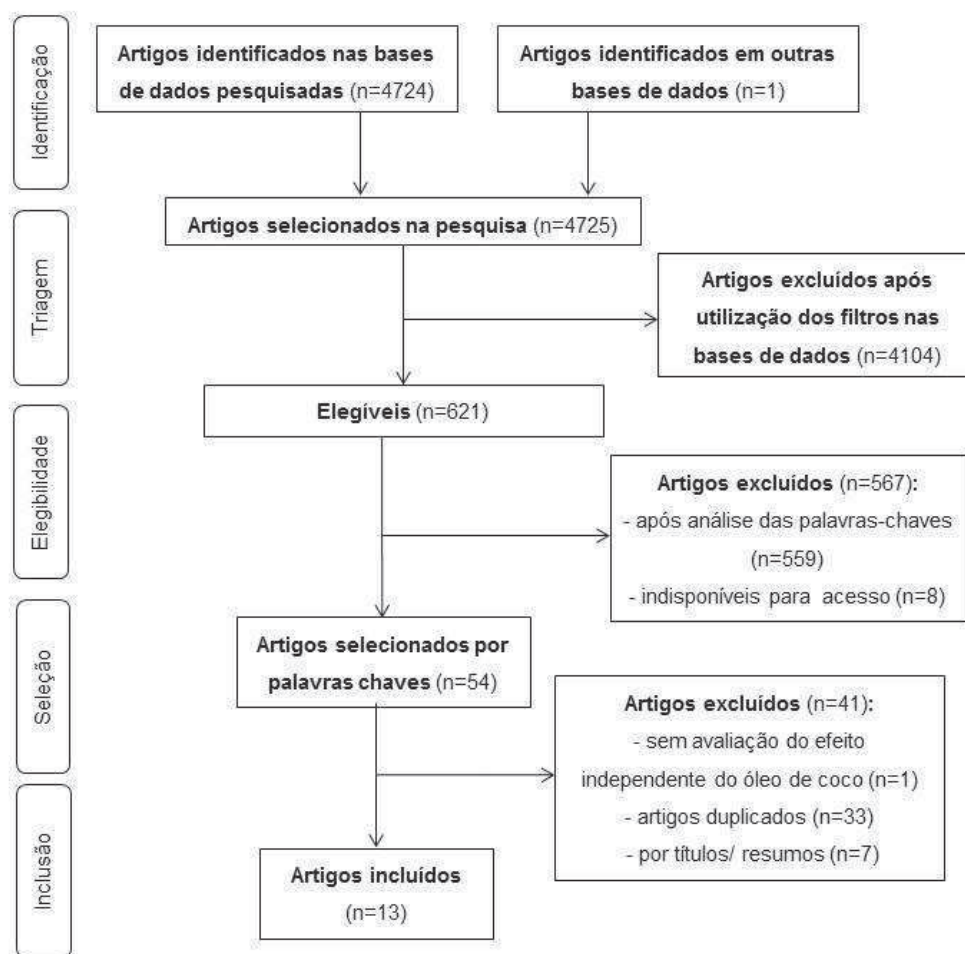


Figura 1 – Fluxograma da seleção de estudos para revisão sistemática. Science Direct, <http://www.sciencedirect.com/science/search>; PubMed, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/advanced>; Scopus, <https://www.scopus.com/>, n = número.

Considerando outras fontes de SFA, o óleo de coco melhorou o perfil lipídico em comparação à manteiga, com redução das concentrações de CT ($-9,9 \pm 6,4$ mg/dL)^{16, 19}, LDL ($-1,6 \pm 30,9$ mg/dL)¹⁶ e TG ($-17,7 \pm 102$ mg/dL)¹⁶. As concentrações de TG também foram menores quando comparadas ao consumo da gordura de carne ($-17,7 \pm 102$ mg/dL)¹².

Em comparação ao óleo de palma^{14, 15} e à gordura de carne¹², ambos fonte de ácidos graxos saturados de cadeia longa, o óleo de coco aumentou as concentrações de CT ($26,1 \pm 18,3$ mg/dL^{14, 15} e 12 ± 3 mg/dL¹², respectivamente). Em relação à LDL, essa foi maior somente quando comparada ao óleo de palma ($22,3 \pm 14,5$ mg/dL)^{14, 15}.

Para a fração de HDL, observou-se um aumento em sua concentração sérica, advindo do consumo de óleo de coco, quando comparado aos ácidos graxos poli-insaturados^{12, 19, 21, 22}, aos monoinsaturados¹⁴ e aos saturados^{12, 14, 15, 19}.

Com relação ao tempo de tratamento, estudos de curta duração (4 a 6 semanas)^{12, 14-17, 19} apresentaram inconsistência dos resultados em relação às concentrações de CT, LDL e TG. Por outro lado, dos estudos de longa duração (>6 semanas)^{13, 22, 23}, somente Mendis e colaboradores¹³ observaram aumento das concentrações de CT (35,9±14,3 mg/dL). Já as concentrações de HDL aumentaram tanto em estudos de curta^{12, 14, 15, 19} quanto de longa duração^{22, 23}.

Quanto ao estado nutricional, o consumo de óleo de coco, tanto em indivíduos com excesso de peso (IMC≥25 Kg/m²),^{13, 16, 17, 19, 22, 23} quanto em indivíduos eutróficos (IMC 18,5 a 24,9 Kg/m²),^{12, 14, 15} resultaram em aumento das concentrações de CT^{12-17, 19}, LDL^{12, 14-17, 19} e TG^{12, 14}. Além disso, em indivíduos com excesso de peso foi possível observar também a redução de CT^{16, 19}, LDL¹⁶ e TG¹⁶, enquanto em indivíduos eutróficos apenas as concentrações de TG reduziram¹². Quanto às concentrações de HDL, essas também se encontravam aumentadas tanto em indivíduos com excesso de peso^{19, 22, 23} quanto em eutróficos^{12, 14, 15}, após o consumo do óleo de coco. Em 2 estudos não foram apresentados o estado nutricional dos voluntários^{13, 17}.

Em estudos realizados tanto com indivíduos saudáveis^{12-15, 19, 22} como hipercolesterolêmicos^{16, 17}, o consumo do óleo de coco resultou em aumento (25,8±12,1 mg/dL^{12-15, 19} e 15,9±3 mg/dL^{16, 17}, respectivamente) e em redução das concentrações de CT (-5,4±36,1 mg/dL¹⁹ e -14,4±31 mg/dL¹⁶, respectivamente). Em indivíduos saudáveis a concentração de LDL aumentou (21,3±10,1 mg/dL)^{12, 14, 15, 19} e em hipercolesterolêmicos os resultados foram controversos (14,5±2 mg/dL^{16, 17} e -11,6±30 mg/dL¹⁶). O aumento das concentrações de HDL ocorreu somente em indivíduos saudáveis (4,4±1,4 mg/dL)^{12-15, 19, 22} e, em 1 estudo onde os voluntários apresentavam, além da hipercolesterolemia, diabetes e doenças cardiovasculares (3,1±7,4

mg/dL)²³. Os TG se comportaram de forma contraditória em indivíduos saudáveis ($10,8 \pm 6,7$ mg/dL^{12, 14} e $-10 \pm 3,6$ mg/dL¹²) e foram reduzidos em hipercolesterolêmicos ($-17,7 \pm 102$ mg/dL)¹⁶.

A quantidade de lipídeos totais das dietas consumidas variou de 21 a 38,3% do valor calórico total (VCT) (Tabela 2), sendo que o único estudo realizado com dieta hipolipídica (<25% do VCT)²² apresentou aumento ($3,2 \pm 4,8$ mg/dL) das concentrações de HDL. Os estudos realizados com dietas normolipídicas (25 a 35% do VCT)^{12-15, 23} apresentaram aumento de CT ($27,7 \pm 11$ mg/dL)¹²⁻¹⁵, de LDL ($23,9 \pm 8,4$ mg/dL)^{12, 14, 15}, de HDL ($4,5 \pm 1,1$ mg/dL)^{12, 14, 15, 23} e tanto aumento ($10,8 \pm 4,8$ mg/dL)^{12, 14}, quanto redução ($-10 \pm 3,6$ mg/dL)¹² de TG.

Em estudos com dietas hiperlipídicas (>35% do VCT)^{16, 17, 19}, observaram-se efeitos controversos advindos do consumo de óleo de coco, com aumento ($15,4 \pm 4,4$ mg/dL)^{16, 17, 19} e redução ($-9,9 \pm 6,4$ mg/dL)^{16, 19} das concentrações de CT e aumento ($13,4 \pm 3,4$ mg/dL)^{16, 17, 19} e redução ($-11,6 \pm 30,9$ mg/dL)¹⁶ de LDL. Enquanto as concentrações de HDL aumentaram¹⁹ e de TG reduziram¹⁶ ($3,85 \pm 2,8$ mg/dL e $-17,7 \pm 102$ mg/dL, respectivamente).

A maioria dos estudos^{13, 15-17, 19, 22, 23} não relatou o tipo de óleo de coco fornecido para os voluntários. Dentre os que especificaram, apenas 1 estudo utilizou o óleo de coco virgem, o que resultou em elevação das concentrações de HDL ($3,1 \pm 7,4$ mg/dL)¹², enquanto outro estudo utilizou óleo de coco refinado que, além do aumento do HDL (4 ± 0 mg/dL), resultou também em aumento de CT ($38,5 \pm 0,7$ mg/dL), LDL ($31,8 \pm 1,1$ mg/dL) e TG (18 ± 81 mg/dL)¹⁴.

Além do tipo, as quantidades de óleo de coco fornecidas aos voluntários também foram variadas (1,5 a 33% do VCT). Assim, dos estudos que ofereceram até 10% do VCT de óleo de coco, McKenney e colaboradores¹⁷ observaram aumento das concentrações de CT ($20,2 \pm 21,2$ mg/dL) e de LDL ($17,3 \pm 18,3$ mg/dL). Apenas 3 estudos ofereceram de 10 a 20% do VCT de óleo de coco^{16, 19, 22} e os resultados foram controversos, com aumento e redução de CT ($14,3 \pm 12,3$ mg/dL^{16, 19} e $-14,4 \pm 31$ mg/dL¹⁶, respectivamente) e aumento

e redução de LDL ($11,4 \pm 0,3$ mg/dL^{16, 19} e $-11,6 \pm 22$ mg/dL¹⁶, respectivamente), além de aumento ($4,5 \pm 1,8$ mg/dL)^{19, 22} de HDL e redução ($-17,7 \pm 102$ mg/dL)¹⁶ de TG.

A maior quantidade de óleo de coco foi fornecida aos voluntários no estudo de Ng e colaboradores¹⁴ (33% do VCT) e resultou em uma piora do perfil lipídico ($38,5 \pm 0,71$ mg/dL de CT, $31,8 \pm 1,1$ mg/dL de LDL, $15,5 \pm 72$ mg/dL de TG e $4 \pm 7,8$ mg/dL de HDL).

Outros 2 estudos forneceram 21% do VCT de óleo de coco^{12, 13}. Desses, enquanto o estudo de Reiser e colaboradores¹² resultou em aumento de CT ($20 \pm 9,9$ mg/dL), de LDL ($20 \pm 2,2$ mg/dL), de HDL ($6 \pm 1,1$ mg/dL) e em aumento ($6 \pm 3,7$ mg/dL) e em redução ($10 \pm 3,6$ mg/dL) de TG, Mendis e colaboradores¹³ observaram apenas aumento das concentrações de CT ($35,9 \pm 15,7$ mg/dL) após o consumo dessa quantidade de óleo de coco. Ainda, o estudo de Cardoso e colaboradores²³ forneceu 24,6% do VCT de óleo de coco, o que resultou no aumento de HDL ($3,1 \pm 9,3$ mg/dL).

Além disso, também foram observados aumentos nas concentrações de Apo-AI e Apo-B ($4,7 \pm 12,7$ mg/dL e $6,4 \pm 17,6$ mg/dL, respectivamente) em indivíduos que apresentavam excesso de peso e eram portadores de hipercolesterolemia, diabetes e DCV, após o consumo de dieta normolipídica, por longo período (12 semanas)²³.

Indivíduos com essas mesmas co-morbididades também foram avaliados no estudo de Vijayakumar e colaboradores²⁴. Contudo, ao se comparar o consumo de óleo de coco refinado ao óleo de girassol, não foram observadas alterações no perfil lipídico, mesmo após 2 anos de tratamento. Nesse sentido, em outro estudo¹⁸ também não foi observada alteração desses parâmetros bioquímicos quando o consumo de menos de 10% do VCT de óleo de coco foi comparado ao óleo de palma, por 4 semanas, em indivíduos eutróficos e saudáveis.

Tabela 1 – Efeitos do óleo de coco sobre o perfil lipídico em estudos de intervenção

Referência/ Autor, ano	N. de voluntários e sexo/ idade (anos)*	Desenho do estudo	Características da população**	Tratamento/ Duração da intervenção	Principais resultados do óleo de coco	Pontuação da qualidade da publicação
¹² Reiser, 1985	19♂/ 26	Crossover/ randomizado/ controlado	Eutróficos; Saudáveis	Óleo de coco X gordura da carne X óleo de cártamo; 5 semanas	Óleo de coco X gordura de carne: ↑CT, ↑HDL, ↓TG; Óleo de coco X óleo de cártamo: ↑CT, ↑TG, ↑HDL, ↑LDL	2a
¹³ Mendis, 1990	25♂/ 23	Crossover	Saudáveis	Óleo de coco X óleo de soja; 8 semanas	↑CT	2b
¹⁴ Ng, 1992	20♂, 13♀/ 30	2 braços paralelos/ randomizado	Eutróficos; saudáveis	Óleo de coco X óleo de palma X azeite de oliva; 4 semanas	Óleo de coco X óleo de palma: ↑CT, ↑LDL, ↑HDL; Óleo de coco X azeite de oliva: ↑CT, ↑TG, ↑LDL	2b
¹⁵ Sundram, 1994	17♂/ 21	Crossover/ duplo-cego	Eutróficos; saudáveis	LM: Óleo de coco + óleo de palmiste + óleo de milho X PA: estearina de palma + óleo de palma + óleo de palmiste + óleo de milho; 4 semanas	LM X PA: ↑CT, ↑LDL, ↑HDL	2b
¹⁶ Cox, 1995	13♂, 15♀/ 54	Crossover/ randomizado	Excesso de peso; hipercolesterolêmicos	Óleo de coco X manteiga X óleo de cártamo; 6 semanas	Óleo de coco X manteiga: ↓CT, ↓LDL, ↓TG; Óleo de coco X óleo de cártamo: ↑CT, ↑LDL	2b
¹⁷ McKenney, 1995	6♂, 5♀/ 58	Crossover/ randomizado/ duplo-cego	Hipercolesterolêmicos	Óleo de coco X óleo de canola; 6 semanas	↑CT, ↑LDL	2b
¹⁸ Schwab, 1995	15♀/ 24	Crossover/ Randomizado	Eutróficos; saudáveis	Óleo de coco X óleo de palma; 4 semanas	Óleo de coco X óleo de palma: sem alteração do perfil lipídico	2b

(Continua)

Tabela 1 – Efeitos do óleo de coco sobre o perfil lipídico em estudos de intervenção (Continuação)

Referência/ Autor, ano	N. de voluntários e sexo/ idade (anos)*	Desenho do estudo	Características da população**	Tratamento/ Duração da intervenção	Principais resultados do óleo de coco	Pontuação da qualidade da publicação
¹⁹ Cox, 1998	21♂, 16♀/ 23	3 braços paralelos	Excesso de peso; saudáveis	Óleo de coco X manteiga X óleo de cártamo; 6 semanas	Óleo de coco X manteiga: ↓CT, ↓LDL, ↑HDL; - Óleo de coco X óleo de cártamo: ↑CT, ↑LDL, ↑HDL	2b
²⁰ Mendis, 2001	42♂, 12♀/ 43	2 braços paralelos	Eutróficos; hipercolesterolêmicos	Óleo de coco X óleo de soja; 8 semanas	↓CT, ↓LDL	3b
²¹ Norton, 2004	22♂/ 32	Crossover/ randomizado/ duplo-cego	Eutróficos; saudáveis	Óleo de coco X óleo de soja X óleo de soja hidrogenado; 6 semanas	↑HDL	1b
²² Assunção, 2009	40♀/ 31	Randomizado/ 2 braços paralelos/ duplo-cego/ controlado	Excesso de peso; saudáveis	Óleo de coco X óleo de soja; 30mL/dia/ 12 semanas	↑HDL, ↓razão LDL/ HDL	1a
²³ Cardoso, 2015	72♂, 42♀/ 63	Controlado	Excesso de peso; DCV; diabéticos; hipercolesterolêmicos	Óleo de coco; 13mL/dia/ 12 semanas	Óleo de coco X grupo controle: ↑HDL, ↑ Apo-AI, ↑ Apo-B	2a
²⁴ Vijayakumar, 2016	187♂, 13♀/ 59	Randomizado/ 2 braços paralelos/ simples cego	Excesso de peso; DCV; diabéticos; hipercolesterolêmicos	Óleo de coco X óleo de girassol; 2 anos	Sem alteração do perfil lipídico comparando-se os grupos	1b

N.=número; ♂=homens; ♀=mulheres; ↑=aumento; ↓=redução; CT=colesterol total; HDL=lipoproteína de alta densidade; LDL=lipoproteína de baixa densidade; VLDL=lipoproteína de densidade muito baixa; TG=triglicerídeos; IMC=índice de massa corporal; mL=mililitros; Apo-AI=apolipoproteína A1; Apo-B=apolipoproteína B; DCV=doença cardiovascular; a=estudos controlados; b=estudos não-controlados.

*=valores de média. **Os estudos de Mendis e Kumarasunderam¹³ e McKenney e colaboradores¹⁷ não apresentaram dados de classificação do estado nutricional dos voluntários.

Tabela 2 – Composição nutricional das intervenções dietéticas dos estudos que investigaram os efeitos do óleo de coco sobre o perfil lipídico

REFERÊNCIA	VCT	CHO	PTN	LIP	SFA	MUFA	PUFA	OC*	DIETAS DE COMPARAÇÃO	VCT	CHO	PTN	LIP	SFA	MUFA	PUFA
	(Kcal)	(% do VCT)								(Kcal)	(% do VCT)					
¹² Reiser, 1985	3400	50	15	35	10,4	1,9	0,5	21	Gordura da carne	3400	50	15	35	16,4	18	0,7
									Óleo de cártamo	3400	50	15	35	2,8	3,8	28,1
¹³ Mendis, 1990	2425	59	14	30	27,4	1,8	0,5	21	Óleo de soja	2395	58	14	29	4,6	6,7	17,8
¹⁴ Ng, 1992	2080	51	16	33	25,9	3,9	0,9	33	Óleo de palma	2101	49	16	34	16	14	3,7
									Azeite de oliva	2028	50	16	33	12,1	21,8	2,9
¹⁵ Sundram, 1994	2938	53	16	30	15,6	11,5	3,3	NI	Mistura de óleos: estearina de palma + óleo de palma + óleo de palmiste + óleo de milho	2986	53	16	31	14,7	12,1	3,6
¹⁶ Cox, 1995	2101	45	18	37	21	8	5	19	Manteiga	2054	48	16	36	21	9	2
									Óleo de cártamo	2077	46	20	35	11	9	11
¹⁷ McKenney, 1995	2209	48,1	13,6	38,3	22,3	8,2	7,7	10	Manteiga	2054	48	16	36	8,6	16,6	12,1

Tabela 2 – Composição nutricional das intervenções dietéticas dos estudos que investigaram os efeitos do óleo de coco sobre o perfil lipídico (Continuação)

REFERÊNCIA	VCT	CHO	PTN	LIP	SFA	MUFA	PUFA	OC*	DIETAS DE COMPARAÇÃO	VCT	CHO	PTN	LIP	SFA	MUFA	PUFA
	(Kcal)	(% do VCT)								(Kcal)	(% do VCT)					
¹⁸ Schwab, 1995	1816	45,9	14,3	37	19,7	10,4	4,9	1,5	Óleo de palma	1810	44,2	14,3	38,8	18,8	12,6	5,2
¹⁹ Cox, 1998	1959	47	17	36	NI	NI	NI	18	Manteiga	1959	47	17	36	NI	NI	NI
									Óleo de cártamo	1959	47	17	36	NI	NI	NI
²¹ Norton, 2004	2506	NI	NI	NI	NI	NI	NI	19	Óleo de soja	2517	NI	NI	38	NI	NI	NI
									Óleo de soja hidrogenado	2543	NI	NI	37	NI	NI	NI
²² Assunção, 2009	1696,9	64	16	21	16,5	1,1	0,4	16	Óleo de soja	1700,1	64	14,7	21	3	4,8	10,7
²³ Cardoso, 2015	1584,8	52,5	22,3	24,6	12,4	6,4	2,8	24,6	NI	1579,8	52,2	23,6	25	10,1	7,4	3,1
²⁴ Vijayakumar, 2016	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	Óleo de girassol	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI

VCT=valor calórico total da dieta; CHO=carboidrato; PTN=proteína; LIP=lipídeos; SFA=ácidos graxos saturados; PUFA=ácidos graxos poli-insaturados; MUFA=ácidos graxos monoinsaturados; OC=óleo de coco; Kcal=caloria; NI=não informado.

*os estudos de Sundram e colaboradores¹⁵ e Vijayakumar e colaboradores²⁴ apresentaram dados insuficientes para quantificar a quantidade de óleo de coco fornecida aos voluntários.

5.1.6 Discussão

O consumo de óleo de coco pode exercer efeitos benéficos^{6, 7, 25} ou até mesmo neutros²⁶ sobre o perfil lipídico. Contudo, neste trabalho, a avaliação dos resultados de estudos clínicos de intervenção que avaliaram o efeito do consumo do óleo de coco sobre o perfil lipídico sérico, apesar de controversos, mostra que o óleo de coco influenciou os parâmetros bioquímicos analisados.

Os estudos que compararam o consumo de óleo de coco aos óleos fontes de PUFA ou fontes de outros SFA, tanto animal quanto vegetal, obtiveram resultados contraditórios. Contudo, pode se destacar o aumento do CT, LDL e HDL, quando o óleo de coco foi o substituto de PUFA, e aumento de HDL, quando substituto de outras fontes de SFA.

Quando a comparação dos efeitos do óleo de coco foi realizada com relação ao azeite de oliva, fonte de MUFA foi possível observar elevação de CT e LDL. Contudo, esse resultado deve ser analisado com cautela, principalmente devido ao fato de que apenas um estudo realizou essa comparação¹⁴. Apesar disso, sabe-se que o maior consumo de MUFA, em relação ao consumo de SFA, pode melhorar o perfil lipídico, por reduzir o colesterol total²⁷ e aumentar a HDL²⁷⁻²⁹.

Os efeitos do óleo de coco sobre o perfil lipídico se justificam, entre outros, devido à composição diferenciada desse óleo, que é composto em sua maior parte por ácidos graxos de cadeia média⁵. Esses ácidos graxos apresentam metabolismo hepático distinto e, por isso, podem afetar o metabolismo do colesterol e das lipoproteínas no fígado, suprimindo a atividade do receptor da LDL (LDL-r)⁴. Além do tamanho da cadeia, o maior nível de saturação dos ácidos graxos do óleo de coco também pode reduzir a atividade do LDL-r²³.

Além disso, o óleo de coco também apresenta elevadas concentrações de ácido láurico (C12:0) e ácido mirístico (C14:0)³⁰. Outros estudos já demonstraram a capacidade tanto do ácido láurico⁴ quanto do ácido mirístico^{31, 32}, em aumentar o colesterol total.

O ácido láurico influenciaria as concentrações de colesterol, mais do que os outros lipídios saturados, pelo fato de ser um substrato pobre para as enzimas Δ^6 e Δ^9 desaturases, sofrendo menos o processo de alongamento, ao contrário dos ácidos graxos de cadeia longa. Dessa forma, ele permaneceria por mais tempo como um ácido graxo saturado no organismo, exercendo sua ação sobre o aumento do colesterol^{4, 22}.

No entanto, os resultados que comparam o óleo de coco com outras fontes de SFA não foram consistentes e, nessa revisão, foi possível observar que também houve redução de CT e LDL em relação ao consumo de manteiga^{16, 19}. Esse fato, por sua vez, pode ser explicado pela maior proporção de ácido palmítico (C16:0) presente na manteiga¹⁶, quando comparada ao óleo de coco. Nesse caso, o menor tamanho dos ácidos graxos de cadeia média permite que eles sejam absorvidos diretamente pela circulação portal e sejam oxidados mais rapidamente no fígado, ao contrário dos AGCL³³, contribuindo menos para a elevação do colesterol⁴.

Além disso, o ácido palmítico (C16:0) também pode levar à produção de partículas de VLDL com maior porcentagem de SFA do que lipídios fontes de ácido láurico. O ácido láurico, por sua vez, produz VLDL com mais SFA que o ácido oleico (C18:1). Essa composição diferenciada de VLDL, dependendo da composição de ácidos graxos ingeridos, podendo levar a diferenças de metabolismo dessa lipoproteína, com maior razão de hidrólise para as partículas derivadas da ingestão de C18:1, intermediárias para C12:0 e menores para C16:0, o que pode culminar com diferenças na concentração de LDL, seguindo essa mesma tendência^{4, 31}. Esse fato explica, em partes, os resultados apresentados pelos artigos analisados neste trabalho, onde houve maiores concentrações de LDL e CT após o consumo de dietas ricas em SFA e menores em dietas ricas em MUFA e PUFA.

A hidrólise diminuída de VLDL pode estar associada também ao aumento de TG plasmático³⁴, sendo que esse aumento já foi observado

em outro estudo envolvendo TCM³³. Esse processo, por sua vez, pode levar à formação de partículas de LDL menores, mais densas⁶ e mais susceptíveis à oxidação e que, por isso, podem estar mais associadas ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares³¹.

Com relação à HDL, os estudos avaliados apresentaram elevação dessa lipoproteína após o consumo do óleo de coco^{12, 14, 15, 19, 21, 22}. Além disso, as concentrações de Apo-AI também foram maiores em indivíduos que consumiram óleo de coco²³. Essa apolipoproteína é a maior constituinte da partícula de HDL e sua elevação está associada ao aumento das concentrações de HDL circulantes³⁵. Efeitos benéficos anti-inflamatórios do óleo de coco virgem também foram relacionados à essa maior proporção de Apo-AI nas partículas de HDL, devido à sua composição, rica em compostos antioxidantes, como polifenóis e vitamina^{8, 35}, o que pode evitar a ação pró-inflamatória da LDL²².

Contudo, a comparação dos efeitos do óleo de coco com PUFA, MUFA ou outros SFA deve ser analisada com cautela, pois os resultados inconsistentes dos artigos analisados demonstram que, mais importante do que avaliar a ingestão de uma ou outra fonte de lipídios individualmente, deve-se observar a composição lipídica da dieta como um todo³⁶, pois é a proporção dos ácidos graxos na dieta que pode aumentar ou não o risco de desenvolvimento de hipercolesterolemia³⁷.

Os períodos de intervenção dos estudos avaliados (≥ 4 semanas) foram suficientes para possibilitar a influência do óleo de coco sobre o perfil lipídico^{31, 38}, no entanto, os efeitos do consumo desse óleo em longo prazo ainda não são claros³⁹.

Além disso, a partir dos estudos analisados, foi possível observar que o estado nutricional parece não interferir nos efeitos do óleo de coco sobre os parâmetros bioquímicos, o que corrobora com o estudo de Liao e colaboradores⁴⁰. Contudo, os resultados controversos desses estudos podem ter sido influenciados pelas características da população estudada, já que em alguns estudos a investigação foi realizada em grupos com doenças específicas, como dislipidemias^{16, 17},

além de diabetes, hipertensão, doenças cardiovasculares^{23, 24}, esse fato pode ser considerado um fator de confusão que compromete a avaliação dos resultados desses estudos.

A quantidade de lipídeos totais das dietas consumidas foi variada nos estudos avaliados. Estudos com humanos já demonstraram que dietas ricas em ácido láurico têm a capacidade de aumentar o CT e a LDL, quando comparado a dietas ricas em ácido oleico, tanto normolipídicas⁴¹ quanto hiperlipídicas³¹. Contudo, nesta revisão, foi possível observar que, apesar de um estudo com dieta hipolipídica o consumo de óleo de coco ter elevado as concentrações de HDL²², nos demais estudos, tanto com dietas normolipídicas^{12-15, 23} quanto com dietas hiperlipídicas^{16, 17, 19}, a influência desse óleo sobre os parâmetros bioquímicos foi controversa. Dessa forma, pode-se argumentar que, além da recomendação da quantidade de lipídeos que devem ser consumidos, o óleo fonte desses lipídeos também deve ser levado em consideração para a tomada de decisão sobre a inclusão ou não do óleo de coco na dieta.

Além disso, para inclusão desse óleo na dieta é importante levar em consideração, também, o tipo de óleo de coco a ser consumido e a sua quantidade. Conforme observado, a maioria dos estudos não informou se o óleo de coco utilizado era virgem ou refinado^{13, 15-17, 19, 22, 23} e não houve uma padronização na quantidade ofertada desse óleo.

Já foi demonstrado que o consumo de óleo de coco virgem pode exercer efeitos benéficos sobre o perfil lipídico²⁵, devido à sua maior concentração de compostos antioxidantes e aos efeitos que esses exercem, principalmente sobre a HDL⁸. Além disso, estudos experimentais, que avaliaram o consumo de dietas hiperlipídicas em que toda a proporção de lipídeo consumido era proveniente de óleo de coco virgem, resultaram em redução nos valores de CT^{8, 42}. Contudo, em humanos, as evidências disponíveis não permitem estabelecer a quantidade adequada de óleo de coco que seja mais efetiva para melhoria desses parâmetros.

Além disso, outras limitações encontradas nos artigos analisados são em virtude das suas características metodológicas. Essa inconsistência dos resultados dos trabalhos avaliados pode ser destacada pela avaliação dos artigos (Tabela 1), o que demonstra que esses resultados não são passíveis de comparações e dúvidas ainda persistem sobre os reais benefícios e/ou riscos da utilização do óleo de coco.

5.1.7 Conclusão

Essa revisão sistemática sugere que não há um consenso com relação aos efeitos do consumo de óleo de coco sobre o perfil lipídico sérico, tendo sido observado tanto o aumento das concentrações de colesterol total e LDL após seu consumo, o que sugere cuidado na utilização desse óleo, quanto o aumento de HDL, o que pode ser considerado benéfico.

Dessa forma, pode-se concluir que a evidência científica disponível até o momento é inconsistente e insuficiente para estabelecer uma relação entre o consumo de óleo de coco e o perfil lipídico. Futuros estudos, com delineamentos experimentais mais cuidadosos, maior número amostral e maior tempo de intervenção, se fazem necessários, para inferir sobre o real risco ou benefício do consumo de óleo de coco.

5.1.8 Referências

1. Aranceta J, Pérez-Rodrigo C. Recommended dietary reference intakes, nutritional goals and dietary guidelines for fat and fatty acids: a systematic review. *British Journal of Nutrition*. 2012;107:8-22.
2. Fattore E, Bosetti C, Brighenti F, Agostoni C, Fattore G. Palm oil and blood lipid-related markers of cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis of dietary intervention trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2014:1-20.
3. McQueen MJ, Hawken S, Wang X, Ounpuu S, Sniderman A, Probstfield J, et al. Lipids, lipoproteins, and apolipoproteins as risk markers of myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): a case-control study. *Lancet* 2008;372:224-33.
4. Denke MA, Grundy SM. Comparison of effects of lauric acid and palmitic acid on plasma lipids and lipoproteins. *American Society for Clinical Nutrition*. 1992;56:895-8.
5. Marina AM, Mana YBC, Amin I. Virgin coconut oil: emerging functional food oil. *Trends in Food Science & Technology*. 2009;20:481-7.
6. Palazhy S, Kamath P, Vasudevan DM. Assessment of small, dense LDL particles among subjects consuming coconut oil or sunflower oil as cooking medium by using LDL-cholesterol/LDL-apo B ratio as a surrogate marker. *Journal of Medical Nutrition and Nutraceuticals*. 2014;3(1):39-44.
7. Feranil AB, Duazo PL, Kuzawa CW, Adair LS. Coconut oil predicts a beneficial lipid profile in pre-menopausal women in the Philippines. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 2011;20(2):190-5.
8. Nevin KG, Rajamohan T. Beneficial effects of virgin coconut oil on lipid parameters and in vitro LDL oxidation. *Clinical Biochemistry*. 2004;37:830-5.
9. Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gøtzsche PC, Ioannidis JPA, et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. *Research Methods & Reporting*. 2009:1-27.
10. Verhagen AP, Vet HCWd, Bie RAd, Kessels AGH, Boers M, Bouter LM, et al. The Delphi List: A Criteria List for Quality Assessment of Randomized Clinical Trials for Conducting Systematic Reviews Developed by Delphi Consensus. *Journal of Clinical Epidemiology*. 1998;51(12):1235-41.

11. Mukuddem-Petersen J, Oosthuizen W, Jerling JC. A Systematic Review of the Effects of Nuts on Blood Lipid Profiles in Humans. *The Journal of Nutrition*. 2005;135:2082–9.
12. Reiser R, Probsifield JL, Silvers A, Scott LW, Shorney ML, Wood RD, et al. Plasma lipid and lipoprotein response of humans to beef fat, coconut oil and safflower oil. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1985;42:190-7.
13. Mendis S, Kumarasunderam R. The effect of daily consumption of coconut fat and soya-bean fat on plasma lipids and lipoproteins of young normolipidaemic men. *British Journal of Nutrition*. 1990;63:541-52.
14. Ng TK, Hayes KC, DeWitt GF, Jegathesan M, Satgunasingam N, Ong AS, et al. Dietary palmitic and oleic acids exert similar effects on serum cholesterol and lipoprotein profiles in normocholesterolemic men and women. *Journal of the American College of Nutrition*. 1992;11(4):383-90.
15. Sundram K, Hayes KC, Siru OH. Dietary palmitic acid results in lower serum cholesterol than does a lauric-myristic acid combination in normolipemic humans. *American Society for Clinical Nutrition*. 1994;59:841-6.
16. Cox C, Mann J, Sutherland W, Chiisholm A, Skeaff M. Effects of coconut oil, butter, and safflower oil on lipids and lipoproteins in persons with moderately elevated cholesterol levels. *Journal of Lipid Research*. 1995;36:1787-95.
17. McKenney JM, Proctor JD, Jr JTW, Kolinski RJ, Jr RKE, Coaker JS. The Effect of Supplemental Dietary Fat on Plasma Cholesterol Levels in Lovastatin-Treated Hypercholesterolemic Patients. *Pharmacotherapy*. 1995;15(5):565-5 72.
18. Schwab US, Niskanen LK, Maliranta HM, Savolainen MJ, Kesäniemi YA, Uusitupa MIJ. Lauric and Palmitic Acid-Enriched Diets Have Minimal Impact on Serum Lipid and Lipoprotein Concentrations and Glucose Metabolism in Healthy Young Women. *Human and Clinical Nutrition*. 1995;125:466-73.
19. Cox C, Sutherland W, Mann J, Jong Sd, Chisholm A, Skeaff M. Effects of dietary coconut oil, butter and safflower oil on plasma lipids, lipoproteins and lathosterol levels. *European Journal of Clinical Nutrition*. 1998;52:650-4.

20. Mendis S, Samarajeewa U, Thattil RO. Coconut fat and serum lipoproteins: effects of partial replacement with unsaturated fats. *British Journal of Nutrition*. 2001;85:583-9.
21. Norton D, Angerman S, Istfan N, Lopes SM, Babayan VK, Putz MC, et al. Comparative Study of Coconut Oil, Soybean Oil, and PSJC. 2004;29:1-5.
22. Assunção ML, Ferreira HS, Santos AFd, Jr CRC, Florêncio TMMT. Effects of Dietary Coconut Oil on the Biochemical and Anthropometric Profiles of Women Presenting Abdominal Obesity. *Lipids*. 2009;44:593–601.
23. Cardoso DA, Moreira ASB, Oliveira GMMd, Luiz RR, Rosa G. A coconut extra virgin oil-rich diet increases HDL cholesterol and decreases waist circumference and body mass in coronary artery disease patients. *Nutrición Hospitalaria*. 2015;32(5):2144-52.
24. Vijayakumar M, Vasudevan DM, Sundaram KR, Krishnan S, Vaidyanathan K, Nandakumar S, et al. A randomized study of coconut oil versus sunflower oil on cardiovascular risk factors in patients with stable coronary heart disease. *Indian Heart Journal*. 2016:1-9.
25. Jaarin K, Norliana M, Kamisah Y, Nursyafiza M, Qodriyah HMS. Potential Role of Virgin Coconut Oil in Reducing Cardiovascular Risk Factors. *Experimental & Clinical Cardiology*. 2014;20(8):3399-410.
26. Kumar PD. The role of coconut and coconut oil in coronary heart disease in Kerala, South India. *Tropical Doctor*. 1997;27:215-7.
27. Kocyigit A, Koylu AA, Keles H. Effects of pistachio nuts consumption on plasma lipid profile and oxidative status in healthy volunteers. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. 2006;16:202-9.
28. Mertens E, Mullie P, Deforche B, Johan Lefevre⁴ RC, Inge Huybrechts^{5,6}, and Peter Clarys¹. Cross-sectional study on the relationship between the Mediterranean Diet Score and blood lipids. *Nutrition Journal*. 2014;13(88):1-8.
29. Mielgo-Ayuso J, Collado PS, Urdampilleta A, Martínez-Sanz JM, Seco J. Changes induced by diet and nutritional intake in the lipid profile of female professional volleyball players after 11 weeks of training. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 2013;10(55):1-7.
30. DebMandal M, Mandal S. Coconut (*Cocos nucifera* L.: Arecaceae): In health promotion and disease prevention. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2011:241-7.

31. Temme EHM, Mensink RP, Hornstra G. Comparison of the effects of diets enriched in lauric, palmitic, or oleic acids on serum lipids and lipoproteins in healthy women and men. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1996;63:897-903.
32. Fisher EA, Blum CB, Zannis VI, Breslow JL. Independent effects of dietary saturated fat and cholesterol on plasma lipids, lipoproteins, and apolipoprotein E. *The Journal of Lipid Research*. 1983;24:1039-1048.
33. Hill JO, Peters JC, Yang D, Sharp T, Kaler M, Abumrad NN, et al. Thermogenesis in Humans During Overfeeding With Medium-Chain Triglycerides. *Metabolism*. 1989;38(7):641-8.
34. Haug A, Hostmark AT. Lipoprotein Upases, Lipoproteins and Tissue Lipids in Rats Fed Fish Oil or Coconut Oil. *Lipids*. 1987;117:1011-7.
35. Su F, Kozak KR, Imaizumi S, Gao F, Amneus MW, Grijalva V, et al. Apolipoprotein A-I (apoA-I) and apoA-I mimetic peptides inhibit tumor development in a mouse model of ovarian cancer. *PNAS*. 2010;107(46):19997–20002.
36. Dias CB, Garg R, Wood LG, Garg ML. Saturated fat consumption may not be the main cause of increased blood lipid levels. *Medical Hypotheses*. 2014;82:187-95.
37. Müller H, Lindman AS, Brantsæter AL, Pedersen JI. The Serum LDL/HDL Cholesterol Ratio Is Influenced More Favorably by Exchanging Saturated with Unsaturated Fat Than by Reducing Saturated Fat in the Diet of Women. *The Journal of Nutrition*. 2003;133:78–83.
38. Paz Cd, Jimeno C, Sy R, Punzalan FE, Pena Pd. The Effect of Virgin Coconut Oil on Lipid Profile and Fasting Blood Sugar: A Phase I Clinical Trial. *Philippine Journal of Internal Medicine*. 2010;48(2):1-6.
39. Boemeke L, Marcadenti A, Busnello FM, Gottschall CBA. Effects of Coconut Oil on Human Health. *Open Journal of Endocrine and Metabolic Diseases*. 2015;5:84-7.
40. Liau KM, Lee YY, Chen CK, Rasool AHG. An Open-Label Pilot Study to Assess the Efficacy and Safety of Virgin Coconut Oil in Reducing Visceral Adiposity. *ISRN Pharmacology*. 2011:1-8.
41. Voon PT, Ng TKW, Lee VKM, Nesaretnam K. Diets high in palmitic acid (16:0), lauric and myristic acids (12:0 + 14:0), or oleic acid (18:1) do not alter postprandial or fasting plasma homocysteine and

inflammatory markers in healthy Malaysian adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2011;94:1451–7.

42. Nevin KG, Rajamohan T. Influence of virgin coconut oil on blood coagulation factors, lipid levels and LDL oxidation in cholesterol fed SpragueDawley rats. *The European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism*. 2008;3:1-8.

5.2 Artigo II: Consumo de óleo de coco aumenta a expressão de marcadores inflamatórios e a incorporação de ácidos graxos saturados em tecidos de ratas Wistar

5.2.1 Resumo

O óleo de coco virgem (*Cocos nucifera* L.) apresenta composição diferenciada de ácidos graxos dos demais óleos o que confere efeitos benéficos para quem o consome. Contudo, a quantidade desse óleo que deve ser adicionada à alimentação ainda não é definida. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da substituição parcial da fonte lipídica da dieta por óleo de coco virgem em relação aos parâmetros antropométricos, bioquímicos, inflamatórios e do estresse oxidativo de ratas *Wistar*. Para tanto, ratas *Wistar* adultas foram aleatoriamente divididas em 4 grupos experimentais (n=8) que, durante 10 semanas, receberam dietas normolipídicas, que diferiam na fonte lipídica utilizada, sendo: G1 – controle AIN-93M, óleo de soja; G2 – substituição de 10,4% do total de lipídeos por óleo de coco; G3 – substituição de 50% do total de lipídeos por óleo de coco; G4 – substituição de 95% do total de lipídeos por óleo de coco. Ao final do período experimental, não foi observada alteração nos parâmetros antropométricos advindos do consumo de óleo de coco, contudo foi possível observar que em G3 houve elevação das concentrações séricas de triglicérides, comparado aos demais grupos que receberam óleo de coco. Além disso, nos tecidos adiposos intra-abdominal, mesentérico e perirrenal e no tecido hepático dos animais foram encontrados maiores teores de ácido cáprico (C10:0), de ácido mirístico (C14:0) e de ácidos graxos saturados (SFA) total nos grupos alimentados com maiores quantidades de óleo de coco, em comparação a G1 e G2. O consumo de óleo de coco também elevou as concentrações de IL-1 β e IL-12. Por outro lado, foi possível observar maior atividade da enzima catalase nos grupos que receberam óleo de coco e redução de MDA em G3, em comparação a G1. Assim, concluiu-se que, apesar do consumo de óleo de coco, em uma dieta normolipídica, aumentar a atividade da enzima catalase e reduzir a

peroxidação lipídica, a substituição de maiores quantidades dos lipídeos da dieta por óleo de coco pode elevar as concentrações plasmáticas de triglicerídeos, bem como podem levar ao maior acúmulo de C10:0, C14:0 e SFA total, tanto no fígado quanto nos diferentes tecidos adiposos. Esses resultados, associados ao aumento das concentrações de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo, ressaltam que o consumo desse óleo deve ser realizado com cuidado e atenção e, portanto, mais estudos se fazem necessários para determinação da quantidade adequada a ser consumida.

Palavras-chaves: óleo de coco virgem, consumo, perfil lipídico, inflamação.

5.2.2 Abstract

The virgin coconut oil (*Cocos nucifera* L.) has a unique composition of oils from other fatty acids which gives benefits to those who consume it. However, the amount of this oil to be added to food is not yet defined. The aim of this study was to evaluate the effects of the partial replacement of the lipid source of the diet for virgin coconut oil in relation to anthropometric, biochemical, inflammatory and oxidative stress in Wistar rats. Therefore, adult Wistar rats were randomly divided into 4 experimental groups (n = 8) for 10 weeks and received normolipidic diets that differed in the lipid source used, as follows: G1 - AIN-93M control, soybean oil; G2 - replacing 10.4% of total lipids of coconut oil; G3 - replacement of 50% of total lipids of coconut oil; G4 - replacing 95% of total lipids of coconut oil. At the end of the experimental period, there was no change in anthropometric parameters arising from coconut oil consumption however, it was observed that in G3 was elevated serum triglycerides, compared to other groups who received coconut oil. Moreover, in fatty intraabdominal, mesenteric and perirenal fat tissue and liver tissue of animals were found larger capric acid content (C10:0), myristic acid (C14:0) and saturated fatty acids (SFA) total in groups fed with higher amounts of coconut oil, compared to G1 and G2. The consumption of coconut oil also increased IL-1 β concentrations and IL-12. Moreover, we observed increased activity of the enzyme catalase in the groups receiving coconut oil and reduced MDA G3 when compared to G1. It is therefore concluded that although coconut oil consumption in a normolipidic diet increase the catalase enzyme activity and reduce lipid peroxidation, replacement of larger quantities of dietary lipids of coconut oil may raise plasma concentrations triglycerides, and can lead to further accumulation of C10:0, C14:0 and the total SFA, both in the liver as in the different adipose tissues. These results, associated with increased concentrations of pro-inflammatory cytokines in adipose tissue, point out that the consumption of oil should be carried out with

care and attention and therefore more studies are necessary to determine the appropriate amount to be consumed.

Keywords: virgin coconut oil, consumption, lipid profile, inflammation.

5.2.3 Introdução

O óleo de coco (*Cocos nucifera* L.) possui composição diferenciada dos demais óleos, apresentando cerca de 90% de ácidos graxos saturados (SFA), dos quais 60 a 63% são ácidos graxos de cadeia média (AGCM)¹. Ainda, a maior proporção desses ácidos graxos é representada pelo ácido láurico (C12:0), seguida pelo ácido mirístico (C14:0)^{2, 3}.

Estudos já demonstraram que essa composição do óleo de coco pode estar associada a um metabolismo diferenciado desse óleo no organismo, o que pode resultar em menor ganho de peso associado a sua ingestão⁴⁻⁷.

Além disso, o óleo de coco virgem apresenta em sua composição elevadas quantidades de fitoquímicos¹ e o seu consumo pode estar associado à melhora do perfil lipídico sérico⁸⁻¹⁰, com aumento da Lipoproteína de Alta Densidade (HDL)⁹. Esses fitoquímicos também podem auxiliar na prevenção do estresse oxidativo, com redução da peroxidação lipídica¹⁰ e da oxidação de proteínas e de lipoproteínas, como a Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL)¹¹.

Contudo, estudos tanto em humanos^{12, 13} quanto em animais^{14, 15} apresentaram resultados controversos advindos do consumo de ácido láurico, com alteração dos parâmetros bioquímicos e dos biomarcadores inflamatórios¹⁴, após sua ingestão. Nesse sentido, nos últimos anos, tem sido recomendada a substituição de dietas com maiores quantidades de SFA por dietas com maiores teores de lipídios insaturados, como fontes de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), para melhoria desses parâmetros¹⁶.

Esses fatos justificam a investigação deste trabalho, que visou determinar a combinação ideal de ingestão de óleo de coco e de óleo de soja na dieta, que resultasse na ingestão de um perfil lipídico mais saudável³. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da substituição parcial da fonte lipídica da dieta por óleo de coco virgem em relação aos parâmetros antropométricos, bioquímicos, inflamatórios e do estresse oxidativo de ratas *Wistar*.

5.2.4 Metodologia

5.2.4.1 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV), sob o número de protocolo 99/2014 (Anexo A).

5.2.4.2 Animais e dietas

Foi realizado um estudo experimental controlado, com duração de 10 semanas. Para tanto, foram utilizadas trinta e duas ratas fêmeas da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*, Rodentia), com 60 dias de vida, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram randomicamente divididos em quatro grupos experimentais, cada um contendo 8 roedores¹⁷, os quais foram mantidos em gaiolas individuais, com ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura média de 22±2 °C.

Os animais receberam dietas formuladas de acordo com as recomendações AIN-93M, propostas pelo *American Institute of Nutrition*¹⁸ para manutenção de animais adultos. Para confecção dessas dietas houve a substituição parcial da fonte lipídica, em diferentes concentrações, por óleo de coco virgem, de forma que se mantivessem isocalóricas (Tabela 1). Assim, foram produzidas as seguintes dietas: dieta controle AIN-93M (4g de óleo de soja/ 100g de dieta, G1); dieta com 10,4% de óleo de coco (0,424g de óleo de coco + 3,58g de óleo de soja/100g de dieta, G2); dieta com 50% de óleo de coco (2,17g de óleo de coco + 2g de óleo de soja/ 100g de dieta, G3); dieta com 95% de óleo de coco (4,12g de óleo de coco + 0,2g de óleo de soja/ 100g de dieta, G4). O cuidado em oferecer no máximo 95% do total de lipídeos como óleo de coco se deveu ao fato de que esse óleo não apresenta todos os ácidos graxos essenciais⁵ e, por isso, eles foram fornecidos a partir do óleo de soja.

Tabela 1 – Composição das dietas experimentais

Ingredientes**	Grupos			
	1	2	3	4
Amido de milho (qsp*)	46,57	46,57	46,57	46,57
Caseína (>85% de proteína)	14	14	14	14
Amido dextrinizado	15,5	15,5	15,5	15,5
Açúcar refinado	10	10	10	10
Óleo de Soja	4	3,58	2	0,2
Óleo de Coco	0	0,424	2,17	4,12
Celulose	5	5	5	5
Mix mineral	3,5	3,5	3,5	3,5
Mix vitamínico	1	1	1	1
L-cistina	0,18	0,18	0,18	0,18
Bitartarato de Colina	0,25	0,25	0,25	0,25
Peso final	100	100,004	100,17	100,32
Kcal total	376,6	376,6	376,6	376,6

Dietas baseadas na recomendação AIN-93M (Reeves et al, 1993). **Dietas (g/100 g); *qsp = quantidade suficiente para; g = gramas; Kcal = quilocalorias.

Ao final do período experimental, os animais foram submetidos ao jejum de 12 horas e, em seguida, anestesiados de 3 a 5 minutos com isoflorano, a 3% (Cristália[®], Brasil) e submetidos à exsanguinação total. Foi coletado o sangue e foram excisados o fígado e os tecidos adiposos intra-abdominal, mesentérico e perirrenal, os quais foram congelados a -80°C para análises posteriores. Além disso, uma pequena porção do tecido adiposo intra-abdominal foi separada para análises histológicas.

5.2.4.3 Análises histológicas

Fragmentos do tecido adiposo intra-abdominal foram removidos e fixados em solução de formalina de Carson¹⁹ tamponada com 1% de cálcio em temperatura ambiente. Em seguida, os tecidos foram desidratados em gradientes crescentes de etanol (70% à 100%) e incluídos em Paraplast Plus (Sigma[®], Suíça). Secções transversais de 5µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo (modelo CUT 4055, Olympus[®], EUA) e coradas com hematoxilina e eosina²⁰. Vinte imagens por animal (80 imagens por grupo) foram capturadas

utilizando-se o microscópio Primo Star 2012 (Zeiss[®], Alemanha), com câmera fotográfica acoplada (Aixo ERc5s, Zeiss[®], Alemanha), com ampliação total de 200x e com 2048x1024 *pixels* de resolução.

O número e a área de adipócitos foram determinados conforme metodologia de Boqué e colaboradores²¹. Resumidamente, as imagens foram analisadas com o *software* Adiposoft (Adiposoft from CIMA, University of Navarra), validado por Galarraga e colaboradores²². Para área, utilizou-se o fator de calibração no Adiposoft igual a 0.17 e, para a contagem das células, determinou-se a área de cada foto (141164,2 μ^2). O número de adipócitos foi expresso pela área da foto.

5.2.3.4 Análises bioquímicas

Glicose, triglicerídeos (TG), colesterol total (CT) e HDL-colesterol (HDL-c) foram dosados nas amostras de soro, por meio de métodos enzimáticos colorimétricos, utilizando-se kits comerciais (Bioclin[®], Brasil) e o aparelho BS200 (Mindray[®], China). A concentração de LDL-colesterol (LDL-c) foi calculada segundo a equação de Friedewald e colaboradores²³.

5.2.4.5 Perfil de ácidos graxos dos óleos utilizados nas dietas e dos tecidos

Os lipídeos dos óleos (coco virgem e soja), do fígado e dos tecidos adiposos (intra-abdominal, mesentérico e perirrenal) foram extraídos utilizando-se o método de Folch e colaboradores²⁴ e saponificados e esterificados, segundo Hartman e Lago²⁵. A identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa (Shimadzu[®], modelo CG-17/ Class, Japão), equipado com detector de ionização e coluna cromatográfica capilar de sílica fundida (biscianopropil polysiloxane SP-2560) de 100 metros de comprimento e 0,25 mm de diâmetro e detector de ionização em chama. A programação de análise utilizada foi temperatura inicial de leitura de 120°C, isotérmica por 10 minutos e posterior aquecimento de

4°C/ minuto até 240°C, permanecendo nessa temperatura por 50 minutos. A temperatura do vaporizador foi de 240°C e do detector de 260°C. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio em 24 cm/seg., a 175°C. A razão *split* da amostra no injetor foi de 1/10 e o volume de injeção foi de 1µL^{26, 27}.

Para identificação dos ácidos graxos presente nas amostras foi realizado a comparação do tempo de retenção das amostras com o padrão de mistura de ácidos graxos (FAME – SupelcoTM de C 4:0 à C 24:0, Sigma-Aldrich[®], EUA), sendo os resultados expressos em percentuais.

5.2.4.6 Dosagem de citocinas inflamatórias

Amostras de tecido adiposo dos animais (100mg/ animal) foram homogeneizadas com tampão fosfato (50 mM, Tween-20 a 0,05% e aprotinina a 5mg/mL) e centrifugadas à 8000g (modelo Z216MK, Hermle[®], Alemanha) por 5 minutos, à 4 °C, e o sobrenadante foi retirado para as análises. As concentrações das citocinas inflamatórias interleucina-1β (IL-1β), interleucina-12 (IL-12), interferon γ (IFN γ) e fator de necrose tumoral α (TNF α) foram determinadas simultaneamente utilizando-se o kit RECYT-65K-04 (IL-1β, IL-12p70, IFN γ e TNF α) (Millipore[®], Alemanha), utilizando-se a tecnologia Luminex xMAP.

5.2.4.7 Determinação das concentrações das enzimas antioxidantes no fígado

A concentração de Superóxido Dismutase (SOD) foi determinada por meio de metodologia de adaptada de Dieterich e colaboradores²⁸. Já a concentração da enzima catalase (CAT) foi determinada pela taxa de decaimento do peróxido de hidrogênio, por meio da metodologia adaptada de Aebi²⁹. As concentrações das enzimas foram determinadas utilizando-se espectrofotômetro (Multiskan GO, Thermo Scientific[®], Finlândia).

5.2.4.8 Avaliação da peroxidação lipídica no tecido hepático

A peroxidação lipídica foi avaliada, conforme metodologia proposta por Buege e Aust³⁰, através da determinação da capacidade do malondialdeído (MDA), um produto secundário da peroxidação lipídica, de reagir com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Merck[®], Alemanha). Para tanto, foi utilizada mensuração espectrofotométrica (Multiskan GO, Thermo Scientific[®], Finlândia), a 535 nm.

5.2.4.9 Determinação de proteínas

A quantidade de proteína presente nas amostras de tecido hepático utilizadas nas análises de CAT, SOD e TBARS foram mensuradas segundo metodologia de Lowry e colaboradores³¹, com leituras em espectrofotômetro (Multiskan GO, Thermo Scientific[®], Finlândia), a um comprimento de onda de 700nm, para que os resultados pudessem ser normalizados pelas concentrações de proteínas.

5.2.4.10 Análises estatísticas

A normalidade das variáveis foi determinada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e, em seguida, as variáveis foram submetidas à análise de variância. As comparações entre os quatro grupos foram realizadas pela análise de variância, ANOVA *one way*, seguida do teste *post hoc* de Tukey para dados com distribuição normal, enquanto que, para os dados não paramétricos, foram aplicados os testes de Kruskal Wallis, complementado pelo teste de comparações múltiplas de Dunn's. O processamento e análise estatística dos dados foram realizados utilizando o *software* SPSS, versão 20 para *Windows* (SPSS INC. Chicago, IL. USA), considerando $\alpha \leq 0,05$. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão para resultados com distribuição normal e mediana \pm intervalo interquartilico para resultados não paramétricos.

5.2.5 Resultados

5.2.5.1 Parâmetros antropométricos

Comparando os diferentes grupos experimentais, observou-se que o peso corporal e o consumo alimentar foram semelhantes ($p>0,05$) (Figura 1).

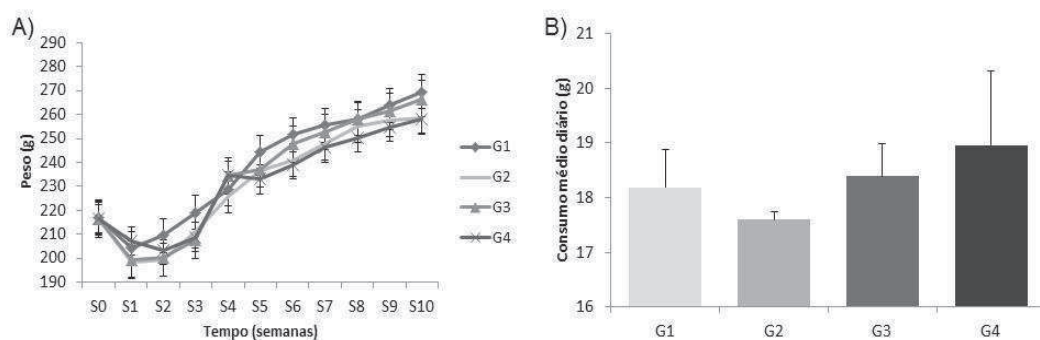


Figura 1 – Efeito do consumo do óleo de coco sobre o peso corporal e o consumo alimentar dos grupos experimentais. (A) média de peso corporal (g)/semana de tratamento; (B) consumo médio diário (g). G1=grupo controle; G2=10,4% de óleo de coco; G3=50% de óleo de coco; G4=95% de óleo de coco. Os valores são expressos como média \pm EP (n=8). ANOVA *one way* seguida de *post hoc* de Tukey, $p>0,05$.

Com relação aos demais parâmetros antropométricos, bem como às diferenças entre as medidas finais e iniciais desses, não foram observadas diferenças entre os grupos ($p>0,05$) (Tabela 2). Além disso, também não foram observadas diferenças relacionadas ao coeficiente de eficácia alimentar, ao peso do fígado e ao índice hepatossomático entre os grupos experimentais ($p>0,05$) (dados não mostrados).

Tabela 2 – Efeito da substituição da fonte lipídica da dieta por óleo de coco nos parâmetros antropométricos

Parâmetros	G1	G2	G3	G4	p
Peso inicial (g)	217±3,92	216,63±4,09	216,38±4,58	216,50±4,79	0,999
Peso final (g)	269,63±6,26	258,50±5,96	259,71±3,17	258,1 ±10,83	0,642
Δ Peso	52,50±3,0	41,86±5,56	44,29±3,75	41,63±7,89	0,460
IMC inicial (g/cm ²)	0,55±0,13	0,53±0,01	0,53±0,01	0,55±0,02	0,790
IMC final (g/cm ²)	0,64±0,03	0,59±0,02	0,64±0,02	0,62±0,02	0,473
Δ IMC	0,09±0,03	0,07±0,02	0,13±0,03	0,08±0,02	0,256
Perímetro abdominal inicial (cm)	12,66±0,26	12,78±0,22	12,80±0,29	13,16±0,32	0,607
Perímetro abdominal final (cm)	16,65±0,71	15,90±0,31	16,09±0,39	15,53±0,39	0,180
Δ perímetro abdominal (cm)	3,99±0,76	3,13±0,35	3,29±0,46	2,36±0,32	0,127
Perímetro torácico inicial (cm)	13,60±0,18	13,21±0,23	13,33±0,23	13,40±0,25	0,670
Perímetro torácico final (cm)	15,20±0,17	14,68±0,15	14,81±0,42	14,64±0,23	0,439
Δ perímetro torácico	1,60±0,18	1,46±0,29	1,49±0,39	1,24±0,25	0,841

G1=grupo controle; G2=10,4% de óleo de coco; G3=50% de óleo de coco; G4= 95% de óleo de coco. Δ = diferença entre os tempos finais e iniciais de cada parâmetro. Valores expressos em média ± DP (n=8). ANOVA *one way* seguida de *post hoc* de Tukey.

5.2.5.2 Análises histológicas do tecido adiposo

Os resultados das análises histológicas do tecido adiposo intra-abdominal estão representados na Figura 2, onde é possível constatar que o consumo de óleo de coco, independente da quantidade, não afetou o número e nem a área dos adipócitos ($p>0,05$).

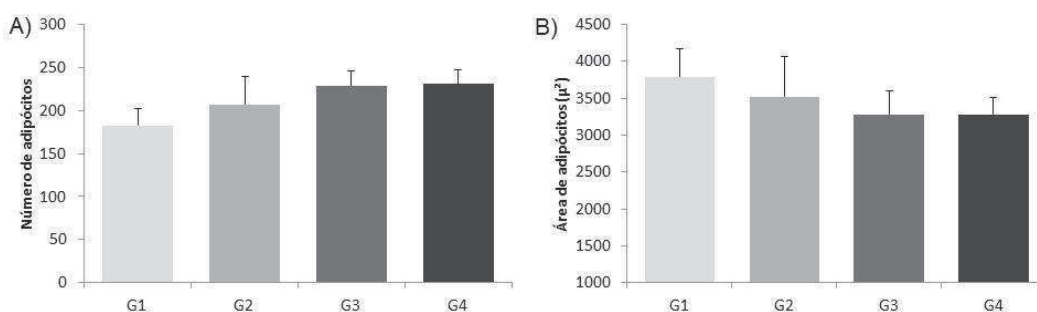


Figura 2 – Efeito do consumo de óleo de coco sobre a morfometria do tecido adiposo de ratos *Wistar*. (A) número de adipócitos; (B) área de adipócitos (µ²). G1=grupo controle; G2=10,4% de óleo de coco; G3=50% de óleo de coco; G4=95% de óleo de coco. Os valores são expressos como média ± EP (n=8). ANOVA *one way* seguida de *post hoc* de Tukey, $p>0,05$.

5.2.5.3 Parâmetros bioquímicos

Com relação aos parâmetros bioquímicos, a substituição de 50% do total de lipídios da dieta por óleo de coco elevou as concentrações séricas de triglicerídeos, comparado à substituição de 10,4% e 95% ($p=0,004$), sem alterar as concentrações de colesterol, HDL, LDL e glicose ($p>0,05$) (Figura 3).

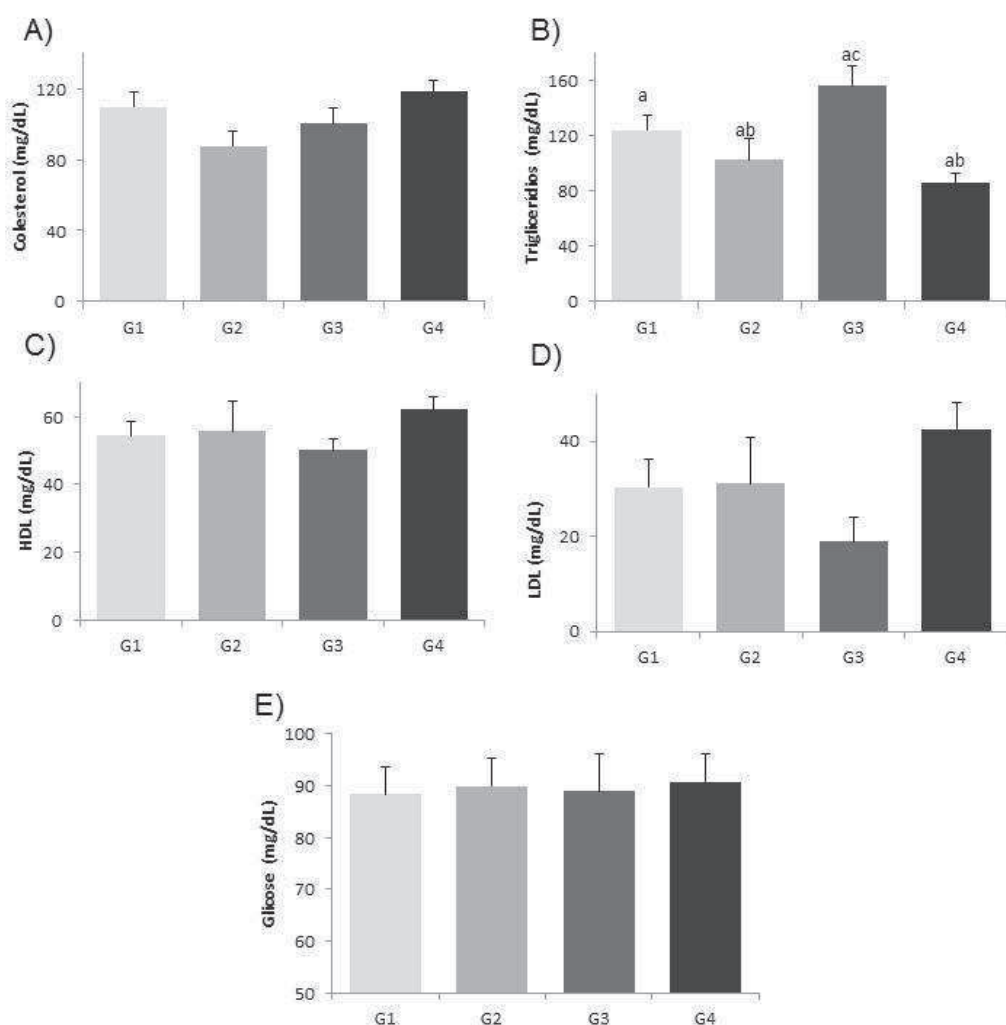


Figura 3 – Efeito do consumo de óleo de coco sobre parâmetros bioquímicos de ratas *Wistar*. (A) Concentrações séricas de Colesterol (mg/dL); (B) concentrações séricas de Triglicerídeos (mg/dL); (C) concentrações séricas de HDL (mg/dL); (D) concentrações séricas de LDL (mg/dL). G1=grupo controle; G2=10,4% de óleo de coco; G3=50% de óleo de coco; G4=95% de óleo de coco. Os valores são expressos como média \pm EP (n=8). ^{a,b,c} Diferenças entre os tratamentos são indicadas por letras diferentes e foram consideradas estatisticamente significantes se $p<0,05$; ANOVA *one way* seguida de *post hoc* de Tukey.

5.2.5.4 Perfil de ácidos graxos dos óleos utilizados nas dietas e dos tecidos hepático e adiposos

A composição dos óleos utilizados para elaboração das dietas experimentais está apresentada na Tabela 3, onde se observa uma maior proporção de ácidos graxos de cadeia média e longa nos óleos de coco e de soja, respectivamente.

Tabela 3 – Perfil de ácidos graxos dos óleos utilizados para elaboração das dietas experimentais

Ácido Graxo	Concentrações (%)	
	Óleo de Coco	Óleo de soja
C8:0	5,22	-
C10:0	5,41	-
C12:0	51,64	-
C14:0	19,86	0,04
C16:0	8,82	10,57
C18:0	3,04	4,90
SFA total	94,03	15,55
C18:1	5,10	24,10
MUFA total	5,12	24,16
C18:2	0,70	52,00
C18:3	-	5,86
PUFA total	0,69	58,43
AGCM total	62,27	-
AGCL total	37,60	100

Óleo de coco (Dr. Orgânico®, Porto Feliz, Brasil) e óleo de soja (Soya, BUNGE®, Brasil). A identificação dos ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa. C8:0=ácido caprílico; C10:0=ácido cáprico; C12:0=ácido láurico; C14:0=ácido mirístico; C16:0=ácido palmítico; C18:0=ácido esteárico; C18:1=ácido oleico; C18:2=ácido linoleico; C18:3=ácido linolênico; SFA=ácidos graxos saturados; MUFA=ácidos graxos monoinsaturados; PUFA=ácidos graxos poli-insaturados; AGCM=ácidos graxos de cadeia média; AGCL = ácidos graxos de cadeia longa. Os valores são apresentados em g/100g.

O perfil de ácidos graxos foi analisado, também, no tecido hepático (Tabela 4) e nos tecidos adiposos intra-abdominal, mesentérico e perirrenal (Tabela 5). No tecido hepático, foi possível observar que no grupo G4 foram encontrados maiores teores de ácido cáprico (C10:0), um ácido graxo de cadeia média, em comparação com o grupo G2 ($p=0,002$), e de ácido mirístico (C14:0), em comparação com G2 e G1 ($p<0,001$).

Os teores de SFA total ($p=0,002$) e MUFA total ($p<0,001$) foram maiores nos grupos G3 e G4, em comparação aos demais grupos experimentais. Em contrapartida, maiores teores de PUFA total foram observados nos animais dos grupos G1 e G2 em comparação com os demais grupos ($p<0,001$).

Tabela 4 – Efeito da substituição da fonte lipídica da dieta por óleo de coco no perfil lipídico de fígado de ratas *Wistar*

Ácidos graxos	Fígado				p
	G1	G2	G3	G4	
C10:0	0,22±0,01 ^{ab}	0,08±0,01 ^a	0,23±0,02 ^{ab}	0,70±0,23 ^b	0,002 [§]
C12:0	0,21±0,04	0,37±0,20	0,43±0,13	0,15±0,03	0,320
C14:0	0,48±0,08 ^a	0,55±0,07 ^a	0,99±0,09 ^{ab}	1,63±0,21 ^b	<0,001 [§]
C16:0	23,76±0,63 ^a	23,46±0,58 ^a	27,87±1,21 ^{ab}	29,30±0,50 ^b	<0,001 [§]
C18:0	13,83±1,18	14,71±0,82	12,33±1,19	11,06±0,91	0,075
SFA total	38,43±0,84^a	39,18±1,37^a	42,31±0,52^b	40,71±0,53^b	0,002⁺
C18:1	20,86±1,78 ^a	20,03±0,84 ^a	27,32±1,45 ^b	32,67±1,4 ^c	<0,001 [§]
MUFA total	22,81±1,92^a	22,23±1,07^a	31,24±1,87^b	37,84±1,76^b	<0,001[§]
C18:2	18,20±1,14 ^a	17,40±2,13 ^a	11,21±1,14 ^b	5,34±0,31 ^c	<0,001 ⁺
C18:3	0,75±0,08	0,85±0,12	0,42±1,10	0,46±0,07	0,059
PUFA total	37,88±1,60^a	37,60±1,83^a	26,04±2,11^b	18,54±1,53^c	<0,001

A identificação dos ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa. C8:0=ácido caprílico; C10:0=ácido cáprico; C12:0=ácido láurico; C14:0=ácido mirístico; C16:0=ácido palmítico; C18:0=ácido esteárico; C18:1=ácido oleico; C18:2=ácido linoleico; C18:3=ácido linolênico; SFA=ácidos graxos saturados; MUFA=ácidos graxos monoinsaturados; PUFA=ácidos graxos poli-insaturados. G1=grupo controle; G2=10,4% de óleo de coco; G3=50% de óleo de coco; G4=95% de óleo de coco. Os valores são expressos em média ± EP para amostras com distribuição normal e em mediana ± intervalo interquartilico para amostras com distribuição não normal (n=8). ^{a,b,c} Diferenças entre os tratamentos são indicadas por letras diferentes e foram consideradas estatisticamente significantes se $p<0,05$, ⁺ANOVA *one way* seguida de *post hoc* de Tukey; [§]Kruskal Wallis complementado pelo teste de Dunn's.

Com relação aos diferentes tecidos adiposos, o tecido adiposo intra-abdominal apresentou maiores teores de C10:0 nos grupos G3 e G4 ($p<0,001$). No tecido adiposo mesentérico, foram observados maiores teores desse mesmo ácido graxo no grupo G4, seguido pelo grupo G3 ($p<0,001$). Resultado semelhante foi observado para o tecido adiposo perirrenal ($p<0,001$).

Os teores de C14:0 também foram maiores nos grupos G3 e G4 nos tecidos adiposos intra-abdominal ($p<0,001$) e perirrenal ($p=0,001$), em comparação como os demais grupos. No tecido adiposo

mesentérico, esse ácido graxo apresentou-se aumentado no grupo G4, seguido G3 ($p < 0,001$).

Já os teores de SFA total foram maiores nos grupos G3 e G4 nos tecidos adiposo intra-abdominal ($p < 0,001$), mesentérico ($p = 0,008$) e perirrenal ($p = 0,005$).

Com relação ao total de MUFA, menores teores foram observados no grupo G3, em comparação ao grupo G1, no tecido adiposo intra-abdominal ($p = 0,036$). Já no tecido adiposo perirrenal, esses ácidos graxos estavam aumentados no G4, em comparação com os grupos G1 e G2 ($p = 0,001$).

Por fim, os teores de PUFA total foram menores no grupo G4, seguido pelo grupo G3, em comparação com os demais grupos, para os tecidos adiposos intra-abdominal ($p < 0,001$) e mesentérico ($p < 0,001$). No tecido adiposo perirrenal, menores teores desses ácidos graxos foram observados no grupo G4, em comparação aos grupos G1 e G2 ($p = 0,001$).

Tabela 5 – Efeito da substituição da fonte lipídica da dieta por óleo de coco no perfil lipídico dos diferentes tecidos adiposos de ratas Wistar

Ácidos graxos	Tecido adiposo intra-abdominal					Tecido adiposo mesentérico					Tecido adiposo perirrenal				
	G1	G2	G3	G4	p	G1	G2	G3	G4	p	G1	G2	G3	G4	p
C10:0	0,11±0,03 ^a	0,38±0,03 ^a	2,26±0,24 ^b	3,70±0,37 ^b	<0,001 [§]	0,08±0,01 ^a	0,50±0,03 ^a	2,46±0,10 ^b	4,60±0,18 ^c	<0,001 ⁺	0,10±0,01 ^a	0,60±0,05 ^a	2,50±0,28 ^b	5,11±0,39 ^c	<0,001 [§]
C12:0	-	0,04±0,02	0,04±0,02	0,06±0,01	0,672	0,06±0,01	0,06±0,01	0,03±0,01	0,11±0,06	0,073	0,05±0,02	0,02±0,01	0,10±0,07	0,05±0,01	0,129
C14:0	1,04±0,03 ^a	1,26±0,04 ^a	2,29±0,47 ^b	4,10±0,25 ^b	<0,001 [§]	1,05±0,05 ^a	1,43±0,04 ^a	3,08±0,13 ^b	5,07±0,14 ^c	<0,001 ⁺	1,16±0,04 ^a	1,65±0,04 ^a	3,15±0,24 ^b	3,90±0,85 ^b	0,001 ⁺
C16:0	24,61±0,40	24,59±1,03	26,19±0,87	26,15±0,50	0,252	24,73±0,41 ^a	25,13±0,61 ^a	27,93±0,52 ^b	30,16±0,92 ^b	<0,001 ⁺	20,88±3,00 ^a	23,95±0,68 ^a	26,82±0,79 ^a	26,99±0,74 ^a	0,004 [§]
C18:0	12,54±6,50 ^a	32,48±7,50 ^{ab}	45,70±0,62 ^b	41,36±6,59 ^b	0,002 [§]	19,73±8,05	20,74±8,52	39,52±6,18	24,49±8,19	0,194	14,22±6,21 ^a	37,25±5,33 ^b	33,80±6,45 ^b	41,21±5,73 ^b	0,006 [§]
SFA total	38,63±6,54^a	59,04±7,59^{ab}	76,66±0,95^b	75,60±6,28^b	<0,001[§]	46,01±8,35^a	45,65±8,22^a	73,35±6,33^b	64,72±7,90^b	0,008[§]	26,42±4,41^a	26,51±0,69^a	33,89±0,63^{ab}	37,11±3,36^b	0,005⁺
C18:1	30,56±6,71	12,25±7,96	-	-	0,211	22,33±7,93	26,18±7,70	-	21,37±8,12	0,309	40,28±0,94	-	18,84±11,74	-	0,414
MUFA total	35,43±6,55^a	16,91±7,95^{ab}	6,25±0,22^b	13,64±6,39^{ab}	0,036[§]	26,68±7,67	30,75±7,45	12,21±5,86	28,65±8,06	0,233	45,92±0,78^a	47,19±1,05^a	49,42±1,81^{ab}	54,68±1,55^b	0,001[§]
C18:2	24,32±1,14 ^a	21,87±1,05 ^a	14,60±0,64 ^b	9,12±2,07 ^c	<0,001 ⁺	24,06±1,19 ^a	21,89±1,10 ^a	12,80±0,55 ^b	5,39±0,47 ^c	<0,001 ⁺	22,65±3,12 ^a	19,77±2,86 ^a	13,45±0,81 ^{a^b}	4,58±0,83 ^b	0,001 [§]
C18:3	-	0,30±0,12	0,20±0,05	0,13±0,01	0,628	0,46±0,43	-	0,40±0,18	2,47±2,39	0,990	-	0,06±0,03	0,18±0,11	0,04±0,01	0,186
PUFA total	24,92±1,18^a	22,91±1,02^a	15,36±0,68^b	9,73±0,83^c	<0,001⁺	24,8±1,16^a	22,53±1,11^a	13,39±0,59^b	5,79±0,57^c	<0,001⁺	23,11±3,13^a	20,43±2,85^a	14,34±1,16^{ab}	4,85±0,81^b	0,001[§]

A identificação dos ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa. C8:0=ácido caprílico; C10:0=ácido cáprico; C12:0=ácido láurico; C14:0=ácido mirístico; C16:0=ácido palmítico; C18:0=ácido esteárico; C18:1=ácido oleico; C18:2=ácido linoleico; C18:3=ácido linolênico; SFA=ácidos graxos saturados; MUFA=ácidos graxos monoinsaturados; PUFA=ácidos graxos poli-insaturados. G1=grupo controle; G2=10,4% de óleo de coco; G3=50% de óleo de coco; G4=95% de óleo de coco. Os valores são expressos em média ± DP para amostras com distribuição normal e em mediana ± intervalo interquartilico para amostras com distribuição não normal (n=8). ^{a,b,c}

Diferenças entre os tratamentos são indicadas por letras diferentes e foram consideradas estatisticamente significantes se p<0,05, ⁺ANOVA *one way* seguida de *post hoc* de Tukey; [§]Kruskal Wallis complementado pelo teste de Dunn's.

5.2.5.5 Citocinas inflamatórias no tecido adiposo intra-abdominal

As análises das citocinas inflamatórias no tecido adiposo intra-abdominal revelam que os animais que receberam óleo de coco, independente da concentração, apresentaram maiores concentrações de IL-1 β ($p=0,039$), quando comparados aos animais que receberam óleo de soja. As concentrações de IL-12 foram maiores nos grupos G3 e G4, em comparação com os demais grupos ($p=0,014$). Já as concentrações de IFN γ e TNF α foram semelhantes entre os grupos ($p>0,05$) (Figura 4).

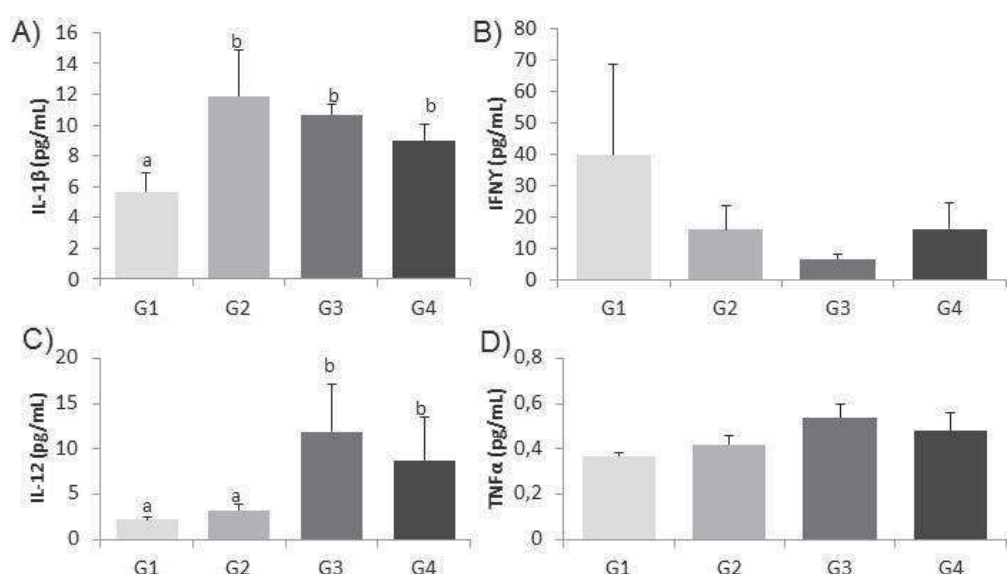


Figura 4 – Concentrações de citocinas inflamatórias no tecido adiposo intra-abdominal de ratos *Wistar*. (A) Interleucina-1 β (mg/mL); (B) Interferon γ (IFN γ) (mg/mL); (C) Interleucina-12 (mg/mL); (D) Fator de necrose tumoral α (TNF α) (mg/mL). G1=grupo controle; G2=10,4% de óleo de coco; G3=50% de óleo de coco; G4=95% de óleo de coco. Os valores são expressos como mediana \pm intervalo interquartilico (n=8). ^{a,b,c} Diferenças entre os tratamentos são indicadas por letras diferentes e foram consideradas estatisticamente significantes se $p < 0,05$; Kruskal Wallis complementado pelo teste de Dunn's.

5.2.5.6 Concentração das enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica no fígado

Com relação à concentração das enzimas do sistema antioxidante no fígado, as concentrações de CAT foram maiores nos grupos que consumiram óleo de coco, independente da quantidade, quando comparados ao grupo controle ($p < 0,001$). Já a concentração de SOD foi semelhante entre os grupos ($p > 0,05$). Com relação à

peroxidação lipídica, as concentrações de MDA foram menores no grupo G3, em comparação ao grupo G1 ($p=0,021$) (Figura 5).

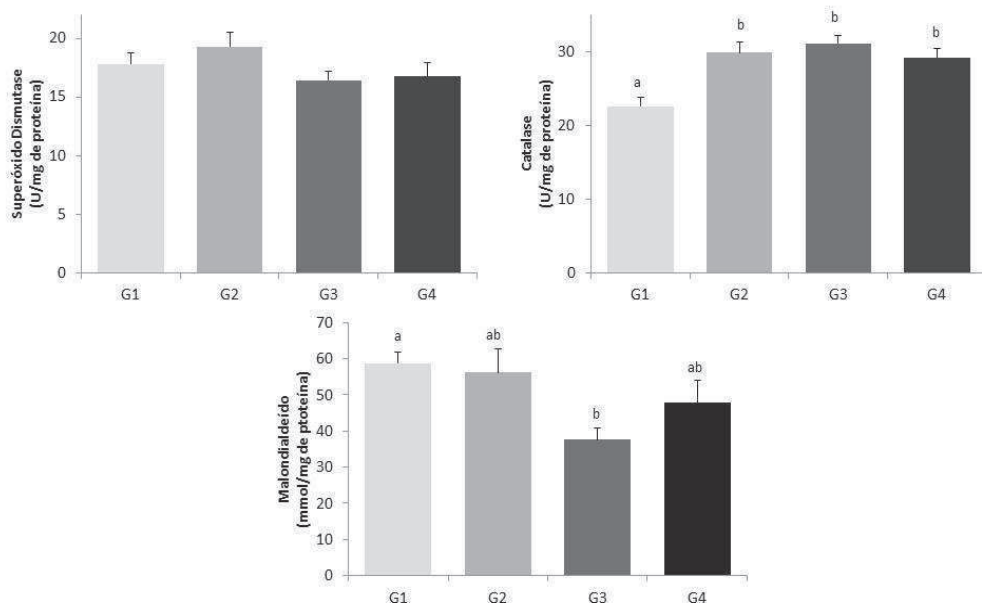


Figura 5 — Efeito do consumo de óleo de coco sobre a concentração das enzimas antioxidantes e a peroxidação lipídica em ratas *Wistar*. (A) atividade da enzima Superóxido Dismutase (U/mg de proteína); (B) atividade da enzima Catalase (U/mg de proteína); (C) Malondialdeído (mmol/mg de proteína). G1=grupo controle; G2=10,4% de óleo de coco; G3=50% de óleo de coco; G4=95% de óleo de coco. Os valores são expressos como média \pm EP (n=8). ^{a,b,c} Diferenças entre os tratamentos são indicadas por letras diferentes e foram consideradas estatisticamente significantes se $p<0,05$; ANOVA *one way* seguida de *post hoc* de Tukey.

5.2.6 Discussão

O óleo de coco não afetou o consumo alimentar e o peso corporal dos animais neste estudo, independente da quantidade ingerida, apesar de já ter sido relatado que o consumo de TCM estaria relacionado com a redução de ambos^{6, 7}. Esse resultado pode ser explicado devido ao tempo de tratamento (10 semanas), pois já foi verificado que em experimentos com longo tempo de duração podem ocorrer adaptação de genes específicos que podem influenciar o ganho de peso dos animais³². Nesse sentido, o estudo de Gerson e Shorland³³, também não observou diferença nesses parâmetros, após 12 semanas de tratamento, em animais que consumiram óleo de coco em uma dieta hiperlipídica (>4g de óleo/ 100g de dieta).

O número e a área dos adipócitos do tecido adiposo intra-abdominal foram semelhantes entre os grupos, independente da fonte

lipídica da dieta consumida. A ausência de resultados significativos pode ser justificada pela pequena quantidade de óleo de coco consumido nos tratamentos, já que Díaz-Villaseñor e colaboradores²⁰, ao fornecerem uma dieta hiperlipídica, cuja fonte lipídica era óleo de coco, a ratos obesos, observaram aumento da área de adipócitos, comparado ao óleo de soja, em uma dieta normolipídica. Além disso, a adaptação gênica após longo tempo de tratamento³², também pode ter influenciado nestes resultados.

O consumo diário de 50% de óleo de coco elevou as concentrações séricas de triglicerídeos, em comparação aos demais grupos. Sabe-se que o ácido láurico (C12:0), presente em grandes quantidade no óleo de coco, e o ácido palmítico (C16:0) podem produzir partículas de Lipoproteínas de Densidade Muito Baixa (VLDL) com mais SFA do que os ácidos graxos insaturados¹⁵. Essa composição diferenciada da VLDL, pode levar a diferenças de metabolismo dessa lipoproteína no fígado, assim, ocorreria uma maior razão de hidrólise das partículas derivadas de ácidos graxos insaturados, em comparação as partículas ricas em C12:0 e C16:0, o que culminaria no aumento das concentrações séricas dos TG^{13, 15, 34}.

Esse aumento não estaria relacionado ao comprimento da cadeia carbônica dos ácidos graxos, mas sim ao seu nível de saturação³⁵. Dessa forma, seria esperado que a maior ingestão de SFA resultasse em concentração sérica mais elevada de triglicerídeos. Contudo, os mecanismos que justificam esse aumento apenas na concentração ingerida de 50% óleo de coco não são claros e, portanto, mais estudos se fazem necessários.

Neste estudo, foi possível observar diferenças na incorporação de ácidos graxos no fígado e nos diferentes tecidos adiposos dos animais que receberam óleo de coco, sendo que resultados semelhantes já foram encontrados em outros estudos^{3, 20, 36}. Os perfis lipídicos desses tecidos refletem a taxa de distribuição, conversão e deposição dos lipídeos no organismo³⁷, e estão diretamente relacionados aos ácidos graxos consumidos na dieta²⁰. Assim, o grupo

alimentado com a menor concentração de óleo de coco (10,4% de óleo de coco) apresentou menor incorporação dos ácidos graxos cáprico (C10:0) e mirístico (C14:0), encontrados em maior quantidade nesse óleo, tanto no fígado quanto nos diferentes tecidos adiposos.

A menor incorporação de AGCM pode ser explicada devido ao seu metabolismo diferenciado, pois eles são transportados diretamente para o fígado, onde sofrem rápida oxidação^{5, 32}. Além disso, os AGCM também podem exercer menor efeito sobre a atividade da enzima lipase lipoteica, diminuindo a sua captação e, conseqüentemente, sua incorporação no tecido adiposo^{4, 27, 32}. Contudo, os resultados obtidos neste estudo sugerem que existe um limite para essa menor incorporação dos AGCM nesses tecidos. Esse fato pode ser exemplificado pelos maiores teores de ácido cáprico (C10:0), de ácido mirístico (C14:0) e de SFA total em animais experimentais que receberam maiores concentrações de óleo de coco.

Em estudos com animais alimentados com óleo de coco como a fonte lipídica em dietas hiperlipídicas, também foi possível observar maior incorporação de SFA totais no tecido adiposo²⁰ e de ácidos graxos de cadeia média, tanto no tecido adiposo quanto no fígado³⁸.

Considerando que os lipídeos consumidos afetam diretamente o metabolismo do tecido adiposo³⁹, essa alteração em seu perfil lipídico pode resultar na modificação das propriedades funcionais das membranas celulares⁴⁰. Assim, os resultados obtidos neste estudo demonstram que o consumo de óleo de coco deve ser realizado com cautela, pois a composição de ácidos graxos dietéticos reflete diretamente em seu armazenamento e, assim, determina a disponibilidade desses ácidos graxos, que podem ser mobilizados, favorecendo sua liberação para o soro^{20, 41, 42}. Além disso, esses lipídeos acumulados são mais aterogênicos, o que aumenta o risco de desenvolvimento de doenças coronarianas³.

Nesse sentido, o aumento da concentração de citocinas inflamatórias no tecido adiposo intra-abdominal, observado nesse estudo, reforça a importância do cuidado na utilização do óleo de coco.

O mecanismo relacionado a essa alteração pode estar relacionado ao fato de que os ácidos graxos saturados podem ser a base da elevação do estado inflamatório⁴³, devido à ativação de TLR4 (*Toll like receptor - receptor do tipo Toll 4*)^{44, 45}.

Além disso, o ácido láurico já foi relacionado ao aumento do estado inflamatório, por iniciar a ativação de TLR4 e a linha de sinalização de células do sistema imune, como macrófagos^{14, 46, 47}, aumentando a resposta inflamatória sistêmica, e refletindo no aumento da resposta imune⁴³.

Assim, já foi demonstrado que dietas hiperlipídicas e ricas em graxos saturados podem aumentar as citocinas pró-inflamatórias, como TNF α ⁴⁸. A inflamação, nesses casos, pode estar relacionada ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, como câncer⁴⁹.

Esses resultados corroboram com o estudo de Carlson e colaboradores⁴³, que observaram um aumento na concentração de citocinas pró-inflamatórias em animais alimentados com 10% do total de lipídeos de TCM, em uma dieta normolipídica, e com o trabalho de Hamsi e colaboradores⁵⁰, que também verificaram o aumento de biomarcadores inflamatórios e de estresse oxidativo em animais que consumiram uma dieta hiperlipídica com substituição completa da fonte lipídica por óleo de coco virgem após aquecimento.

Com relação ao estresse oxidativo, sabe-se que o óleo de coco virgem é o resultado de um processamento conhecido como extração úmida, que se dá, inicialmente, pela obtenção do leite de coco fresco a partir da polpa dos frutos do coco. Em seguida, é produzida uma emulsão que é quebrada, sem o uso de produtos químicos, associada ou a altas temperaturas^{1, 50, 51}. O processamento com o controle de temperatura é o mais desejável⁵², pois permite que o óleo obtido apresente maiores concentrações de fitoquímicos, como polifenóis, tocoferóis e fitoesteróis, que exibem efeito antioxidante e anti-inflamatório, e são termicamente instáveis¹.

Assim, considerando que o estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e o sistema de defesa antioxidante, que culmina na produção desordenada de radicais livres⁵³, os quais podem levar a danos oxidativos em lipídios, proteínas e ácidos nucleicos^{54, 55}, um sistema de defesa antioxidante eficaz é necessário para o controle desses radicais livres.

Esse sistema antioxidante é composto pelas enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase e a catalase. A SOD é uma metaloproteína e é a primeira enzima envolvida na defesa antioxidante, diminuindo a produção de O_2^- . Já a CAT é uma hemoproteína, localizada nos peroxisomos, capaz de catalisar a decomposição do H_2O_2 para água e oxigênio⁵⁶. Por outro lado, o MDA é o produto final da peroxidação lipídica e pode ser utilizado para monitorar o estresse oxidativo em células e tecidos^{57, 58}.

Nesse sentido, Arunima e Rajamohan¹¹ fizeram um estudo comparativo dos efeitos de dietas hiperlipídicas, com diferentes fontes de lipídeos (óleo de coco virgem, azeite de oliva, óleo de girassol e óleo de copra), na capacidade antioxidante de ratos e observaram um aumento da atividade das enzimas antioxidantes e redução da peroxidação lipídica e oxidação de proteínas. Esse mesmo resultado também foi observado por Nevin e Rajamohan⁵⁶, quando compararam os efeitos do óleo de coco virgem ao óleo de copra, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. É provável que a maior quantidade de fitoquímicos, como polifenóis, tocoferóis e fitoesteróis^{1, 52, 59}, no óleo de coco possa ter contribuído para esses resultados^{10, 11, 56}.

Esses mecanismos justificam os resultados obtidos neste estudo, onde foi possível observar aumento da concentração da enzima CAT nos grupos que consumiram óleo de coco em comparação ao grupo controle. Além disso, foi possível observar uma redução nas concentrações de MDA no grupo que consumiu 50% do total de lipídeos como óleo de coco, em comparação com o grupo controle. Contudo, os mecanismos que justificam a redução de MDA apenas

nesse grupo ainda não estão completamente esclarecidos e, portanto, mais estudos se fazem necessários.

5.2.7 Conclusão

O consumo de óleo de coco em uma dieta normolipídica, por um período de 10 semanas, não afetou o consumo alimentar ou o peso corporal de ratas *Wistar*. No entanto, o consumo desse óleo foi capaz de aumentar a concentração da enzima catalase, provavelmente por meio da sua elevada concentração de polifenóis. Esse fato, associado à redução da peroxidação lipídica, sugerem que o óleo de coco virgem apresenta efeitos antioxidantes.

Os resultados desse trabalho também demonstraram que a substituição de maiores quantidades dos lipídeos da dieta por óleo de coco pode elevar as concentrações plasmáticas de triglicerídeos, bem como pode levar ao maior acúmulo de C10:0, C14:0 e SFA total, tanto no fígado quanto nos diferentes tecidos adiposos.

Esses resultados, associados ao aumento das concentrações de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo após o consumo de óleo de coco, independente da concentração, ressaltam que o consumo desse óleo deve ser realizado com cuidado e atenção.

Dessa forma, sugere-se que a substituição de 10,4% do total de lipídeos por óleo de coco é a concentração consumida com menores efeitos adversos e que ainda acarreta benefícios à saúde. No entanto, mais estudos, com enfoque nos mecanismos relacionados à deposição e metabolismo dos TCM desse óleo se fazem necessários.

5.2.8 Referências

1. Marina AM, Mana YBC, Amin I. Virgin coconut oil: emerging functional food oil. *Trends in Food Science & Technology*. 2009;20:481-7.
2. Luo L, Xue M, Vachot C, Geurdenc I, Kaushik S. Dietary medium chain fatty acids from coconut oil have little effects on postprandial plasma metabolite profiles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 2014;420(421):24-31.
3. Chandrashekar P, Lokesh BR, Krishna AGG. Hypolipidemic effect of blends of coconut oil with soybean oil or sunflower oil in experimental rats. *Food Chemistry*. 2010;123:728–33.
4. Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, Funayama K, Miyashita K. Effect of Medium-chain Triacylglycerols on Anti-obesity Effect of Fucoxanthin. *Journal of Oleo Science*. 2007;56(12):615-21.
5. Geliebter A, Torbay N, Bracco EF, Hashim SA, Itallie TBV. Overfeeding with medium-chain triglyceride diet results in diminished deposition of fat. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1983;37:1-4.
6. Bach A, Schirardin H, Chanussot F, Bauer M, Weryha A. Effects of Medium- and Long-Chain Triglyceride Diets in the Genetically Obese Zucker Rat. *The Journal of Nutrition*. 1980;110:686-96.
7. Lavau MM, Hashim SA. Effect of Medium Chain Triglyceride on Lipogenesis and Body Fat in the Rat. *The Journal of Nutrition*. 1978;108:613-20.
8. Palazhy S, Kamath P, Vasudevan DM. Assessment of small, dense LDL particles among subjects consuming coconut oil or sunflower oil as cooking medium by using LDL-cholesterol/LDL-apo B ratio as a surrogate marker. *Journal of Medical Nutrition and Nutraceuticals*. 2014;3(1):39-44.
9. Feranil AB, Duazo PL, Kuzawa CW, Adair LS. Coconut oil predicts a beneficial lipid profile in pre-menopausal women in the Philippines. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 2011;20(2):190-5.
10. Nevin KG, Rajamohan T. Beneficial effects of virgin coconut oil on lipid parameters and in vitro LDL oxidation. *Clinical Biochemistry*. 2004;37:830–5.
11. Arunima S, Rajamohan T. Effect of virgin coconut oil enriched diet on the antioxidant status and paraoxonase 1 activity in ameliorating

the oxidative stress in rats – a comparative study. *Food & Function*. 2013;4:1402–9.

12. Voon PT, Ng TKW, Lee VKM, Nesaretnam K. Diets high in palmitic acid (16:0), lauric and myristic acids (12:0 + 14:0), or oleic acid (18:1) do not alter postprandial or fasting plasma homocysteine and inflammatory markers in healthy Malaysian adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2011;94:1451–7.

13. Temme EHM, Mensink RP, Hornstra G. Comparison of the effects of diets enriched in lauric, palmitic, or oleic acids on serum lipids and lipoproteins in healthy women and men. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1996;63:897-903.

14. Lim W-S, Gan M-S-Y, Ong M-H-L, Chew C-H. Lauric acid abolishes interferon-gamma (IFN-g)-induction of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression in human macrophages. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. 2015:1-5.

15. Denke MA, Grundy SM. Comparison of effects of lauric acid and palmitic acid on plasma lipids and lipoproteins. *American Society for Clinical Nutrition*. 1992;56:895-8.

16. Aranceta J, Pérez-Rodrigo C. Recommended dietary reference intakes, nutritional goals and dietary guidelines for fat and fatty acids: a systematic review. *British Journal of Nutrition*. 2012;107:8-22.

17. Mera R, Thompson H, Prasada C. How to Calculate Sample Size for an Experiment: A Case-Based Description. *Nutritional Neuroscience*. 1998;1(1):87-91.

18. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *American Institute of Nutrition*. 1993;123:1939-51.

19. Carson FL, Martin JH, Lynn JA. Formalin Fixation for Electron Microscopy: A Re-evaluation. *American Journal of Clinical Pathology*. 1973;59:365-73.

20. Díaz-Villaseñor A, Granados O, González-Palacios B, Tovar-Palacio C, Torre-Villalvazo I, Olivares-García V, et al. Differential modulation of the functionality of white adipose tissue of obese Zucker (fa/fa) rats by the type of protein and the amount and type of fat. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2013;24:1798-809.

21. Boqué N, Campión J, Paternain L, García-Díaz DF, Galarraga M, Portillo MP, et al. Influence of dietary macronutrient composition on

adiposity and cellularity of different fat depots in Wistar rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 2009;65(4):387-96.

22. Galarraga M, Campión J, Muñoz-Barrutia A, Boqué N, Moreno H, Martínez JA, et al. Adiposoft: automated software for the analysis of white adipose tissue cellularity in histological sections. *Journal of Lipid Research*. 2012;53:2791–6.

23. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*. 1972;18(6):499-502.

24. Folch J, Lees M, Stanley GHS. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. 1956:497-509.

25. Hartman I, Lago RCA. Rapid preparation of fatty acid methyl ester from lipids. *Londres Laboratory Practice*. 1973;22:475-6.

26. Rosa DD, Lourenço FC, Fonseca ACMd, Sales RLd, Ribeiro SMR, Neves CA, et al. Fish Oil Improves the Lipid Profile and Reduces Inflammatory Cytokines in Wistar Rats With Precancerous Colon Lesions. *Nutrition and Cancer*. 2012:1-11.

27. Han J, Hamilton JA, Kirkland JL, Corkey BE, Guo W. Medium-Chain Oil Reduces Fat Mass and Down-regulates Expression of Adipogenic Genes in Rats. *Obesity Research*. 2003;11(6):734-44.

28. Dieterich S, Bieligg U, Beulich K, Hasenfuss G, Prestle J. Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart - Increased Expression of Catalase in the End-Stage Failing Heart. *Circulation*. 2000;101:33-9.

29. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods of Enzymology*. 1984;105:121-7.

30. Buege JA, Aust SD. In *Methods Enzymol*. New York, Academic Press. 1978:302-10.

31. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall ARJ. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 1951;193:265-75.

32. Ferreira L, Lisenko K, Barros B, Zangeronimo M, Pereira L, Sousa R. Influence of medium-chain triglycerides on consumption and weight gain in rats: a systematic review. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2014;98:1-8.

33. Gerson T, Shorland FB. The Effect of p - Sitosterol on the Metabolism of Cholesterol and Lipids in Rats on a Diet containing Coconut Oil. *Biochemical Journal*. 1965;96:399-403.
34. Haug A, Hostmark At. Lipoprotein Upases, Ljpoproteins and Tissue Lipids in Rats Fed Fish or Coconut Oil. *Lipids*. 1987;117:1011-7.
35. Hill JO, Peters JC, Yang D, Sharp T, Kaler M, Abumrad NN, et al. Thermogenesis in Humans During Overfeeding With Medium-Chain Triglycerides. *Metabolism*. 1989;38(7):641-8.
36. Awad AB. Effect of Dietary Lipids on Composition and Glucose Utilization by Rat Adipose Tissue. *The Journal of Nutrition*. 1981;111:34-9.
37. Arterburn LM, Hall EB, Oken H. Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2006;83:1467S–76S.
38. Leveille GA, Pardini RS, Tillotson JA. Influence of Medium-Chain Triglycerides on Lipid Metabolism in the Rat. *Lipids*. 1967;2(4):287-94.
39. Ip C, Tepperman HM, Witt JD, Tepperman J. The Effect of Diet Fat on Rat Adipocyte Glucose Transport. *Hormone and Metabolic Research*. 1977;9:218-22.
40. Wilson G, Rose SP, Fox CF. The Effect of Membrane Lipid Unsaturation on Glycoside Transport. *Biochemical And Biophysical Research Communications*. 1970;38(4):617-23.
41. Yli-Jama P, Haugen TS, Rebnord HM, Ringstad J, Pedersen JI. Selective mobilisation of fatty acids from human adipose tissue. *European Journal of Internal Medicine*. 2001;12:107-15.
42. Raclot T, Oudart H. Selectivity of fatty acids on lipid metabolism and gene expression. *Proceedings of the Nutrition Society*. 1999;58:633–46.
43. Carlson SJ, Nandivada P, Chang MI, Mitchell PD, O'Loughlin A, Cowan E, et al. The addition of medium-chain triglycerides to a purified fish oil-based diet alters inflammatory profiles in mice. *Metabolism*. 2015;64:274–82.
44. Teng K-T, Chang C-Y, Chang LF, Nesaretnam K. Modulation of obesity-induced inflammation by dietary fats: mechanisms and clinical evidence. *Nutrition Journal*. 2014;13(12):1-15.
45. Kopp A, Bala M, Buechler C, Falk W, Gross P, Neumeier M, et al. C1q/TNF-Related Protein-3 Represents a Novel and Endogenous

Lipopolysaccharide Antagonist of the Adipose Tissue. *Endocrinology*. 2010;151:5267–78.

46. Lee JY, Ye J, Gao Z, Youn HS, Lee WH, Zhao L, et al. Reciprocal Modulation of Toll-like Receptor-4 Signaling Pathways Involving MyD88 and Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT by Saturated and Polyunsaturated Fatty Acids. *The Journal Of Biological Chemistry*. 2003;278(39):37041–51.

47. Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D. Saturated Fatty Acids, but Not Unsaturated Fatty Acids, Induce the Expression of Cyclooxygenase-2 Mediated through Toll-like Receptor 4. *The Journal Of Biological Chemistry*. 2001;276(20):16683–9.

48. Enos RT, Davis JM, Velázquez KT, McClellan JL, Day SD, Carnevale KA, et al. Influence of dietary saturated fat content on adiposity, macrophage behavior, inflammation, and metabolism: composition matters. *Journal of Lipid Research*. 2013;54:152–63.

49. Liu J, Hu S, Cui Y, Sun M-K, Xie F, Zhang Q, et al. Saturated Fatty Acids Up-regulate COX-2 Expression in Prostate Epithelial Cells via Toll-like Receptor 4/NF- κ B Signaling. *Inflammation*. 2014;37(2):467-77.

50. Hamsi MA, Othman F, Das S, Kamisah Y, Thent ZC, Qodriyah HMS, et al. Effect of consumption of fresh and heated virgin coconut oil on the blood pressure and inflammatory biomarkers: An experimental study in Sprague Dawley rats. *Alexandria Journal of Medicine*. 2015;51:53-63.

51. Logeswari P, Kumar VD, Usha PTA, Kumar P. In Vivo Antiinflammatory Effect of Emu Oil (*Dromais Novaehollandiae*) and Virgin Coconut Oil (*Cocos Nucifera*) on Phorbol Ester Induced Acute Inflammatory Model. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2014;5(3):896-9.

52. Krishna G, Raj G, Bhatnagar AS, Kumar P, Chandrashekar P. Coconut Oil: Chemistry, Production and Its Applications - A Review. *Indian Coconut Journal*. 2010:15-27.

53. Jaarin K, Norliana M, Kamisah Y, Nursyafiza M, Qodriyah HMS. Potential Role of Virgin Coconut Oil in Reducing Cardiovascular Risk Factors. *Experimental & Clinical Cardiology*. 2014;20(8):3399-410.

54. Ronis MJJ, Baumgardner JN, Sharma N, Vantrease J, Ferguson M, Tong Y, et al. Medium chain triglycerides dose-dependently prevent liver pathology in a rat model of non-alcoholic fatty liver disease. *Experimental Biology and Medicine*. 2013;238:151–62.

55. Gülen H, Çetinkaya C, Kadioğlu M, Kesici M, Cansev A, Eriş A. Peroxidase Activity and Lipid Peroxidation in Strawberry (*Fragaria X ananassa*) Plants Under Low Temperature. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*. 2008;2(6):95-100.
56. Nevin KG, Rajamohan T. Virgin coconut oil supplemented diet increases the antioxidant status in rats. *Food Chemistry*. 2006;99:260-6.
57. Nevin KG, Rajamohan T. Influence of virgin coconut oil on blood coagulation factors, lipid levels and LDL oxidation in cholesterol fed SpragueDawley rats. *The European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism*. 2008;3:1-8.
58. Subermaniam K, Saad QHM, Das S, Othman F. Virgin Coconut Oil (VCO) Decreases the Level of Malondialdehyde (MDA) in the Cardiac Tissue of Experimental Sprague-Dawley Rats Fed with Heated Palm Oil. *Journal of Medical and Bioengineering*. 2014;3(2):102-6.
59. Nevin KG, Rajamohan T. Wet and dry extraction of coconut oil: impact on lipid metabolic and antioxidant status in cholesterol coadministered rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2009;87:610-6.

6 CONCLUSÃO GERAL

A evidência científica concernente sobre os efeitos do consumo do óleo de coco sobre o perfil lipídico disponível até o momento é inconsistente e insuficiente para estabelecer a relação entre esses dois fatores. Futuros estudos, com delineamentos experimentais mais cuidadosos, maior número amostral e maior tempo de intervenção, se fazem necessários, para inferir sobre o real risco ou benefício do consumo desse óleo.

Da mesma forma, os efeitos do consumo das concentrações de óleo de coco analisadas neste estudo sobre os parâmetros antropométricos, bioquímicos, inflamatórios e do estresse oxidativo em ratas *Wistar* demonstram resultados controversos e reforçam que o consumo desse óleo deve ser realizado com cuidado e atenção. Além disso, mais estudos, com enfoque nos mecanismos relacionados à deposição e metabolismo dos TCM do óleo de coco, se fazem necessários.

APÊNDICE A – CÁLCULO DO TAMANHO AMOSTRAL

Fórmula proposta por Mera et al. (1998):

$$N = \frac{2 \times (\alpha/2 \times DP)^2}{E^2}$$

Na qual:

$\alpha/2$ = Valor da tabela de distribuição t (two-tailed)

DP = desvio padrão

E = diferença que se deseja detectar no estudo

- Variáveis a serem utilizadas para o cálculo:

	Baseline		
	Média±EP Grupo 1	Média±EP Grupo 2	Média±EP para fórmula
Peso (g)	305 ± 9,4	304 ± 5,0	304,5 ± 7,2
n	9	7	8

Fonte: Geliebter et al, 1983

1) $\alpha/2 = 2,998$, considerando um poder estatístico de 98%

2) $DP = SE \times \sqrt{n}$ $DP = 7,2 \times \sqrt{8}$ $DP = 20,4g$

3) $E = 30g$, considerando uma diferença de 20% no ganho de peso entre animais que consumiram triglicerídeos de cadeia longa vs. cadeia média (Geliebter et al, 1983)

$$n = \frac{2 \times (2,998 \times 20,4)^2}{30^2} \quad n = 8,3 \approx 8 \text{ animais por grupo}$$


ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 99/2014, intitulado "Avaliação dos efeitos metabólicos da substituição parcial da fonte lipídica da dieta por óleo de coco extravirgem (cocos nucifera L.) em ratas adultas fêmeas", coordenado pela professora Maria do Carmo Gouveia Peluzio do Departamento de Nutrição e Saúde, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 17/03/2015 com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 99/2014, named "Evaluation of the metabolic effects of partial replacement of lipid for extra virgin coconut oil (cocos nucifera L.) in adult female rats", is in agreement with the actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on March 17, 2015 valid for 12 months.


Prof.ª Atima Clemente Alves Zuanon
Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV